

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA**  
**V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**HPLC hodnocení vybraných léčiv IV.**

**HPLC evaluation of some drugs IV.**



**Hradec Králové 2011**

**Petra Soukupová**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce RNDr. Milanovi Mokrému, Csc. za všestrannou pomoc, cenné rady a odborné vedení.

# Souhrn

## HPLC hodnocení vybraných léčiv IV.

Diplomová práce

Petra Soukupová

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Tato diplomová práce se zabývá hledáním optimálních podmínek pro současnou HPLC analýzu kombinovaných tablet perindoprilu a indapamidu s následným stanovením obsahu. Jako nejvhodnější stacionární fáze byla zvolena kolona LiChro CART 250-4 LiChrospher 100, RP18, 5  $\mu\text{m}$  a mobilní fáze o složení acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) v poměru 40:60 s přídavkem triethylaminu (0,1 ml/100 ml) okyselená kyselinou fosforečnou na pH 3 při průtokové rychlosti 1,4 ml/min a teplotě 50°C. Jako nejvhodnější vnitřní standard byl použit propylparaben. Detekce probíhala při vlnové délce 215 nm za použití UV detektoru. Při stanovení obsahu léčiv v tabletách bylo zjištěno, že se zkoumané látky eluují v následujícím pořadí: perindopril, indapamid a propylparaben.

# **Abstract**

## **HPLC evaluation of some drugs IV.**

### **THESIS**

Petra Soukupová

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,  
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis

This thesis is about looking for the optimal conditions for simultaneous HPLC analysis in combined tablets of perindopril and indapamid with subsequent determination of their content. As the most suitable stationary phase chromatographic column LiChro CART 250-4 LiChrospher 100, RP18, 5  $\mu\text{m}$  was chosen, and the mobile phase formed by mixture of acetonitrile – ammonium phosphate solution (0,05 mol/l) in the ratio 40:60 with addition of triethylamine (0,1 ml/100 ml) acidified with phosphoric acid at pH 3 at a flow rate of 1,4 ml/min and temperature 50°C. Propylparaben was used as the most suitable internal standard. The detection was performed at 215 nm using an UV detector. At the determination of content of medicaments in tablets was found that used compounds were eluted in following order: perindopril, indapamid and propylparaben.

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2. Teoretická část</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Chromatografické metody</b>	<b>8</b>
2.1.1 Historie	8
2.1.2 Definice	8
2.1.3 Rozdělení chromatografických metod	10
<b>2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie</b>	<b>18</b>
2.2.1 Instrumentace	18
2.2.2 Hodnocení HPLC chromatogramu	26
<b>2.3 Vlastnosti zkoumaných látek</b>	<b>28</b>
2.3.1 Perindopril	28
2.3.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti	28
2.3.1.2 Farmakologické vlastnosti	29
2.3.2 Indapamid	31
2.3.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti	31
2.3.2.2 Farmakologické vlastnosti	32
<b>2.4 Přehled prací zabývajících se analýzou perindoprilu a indapamidu</b>	<b>34</b>
<b>3. Cíl práce</b>	<b>37</b>
<b>4. Experimentální část</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Použité přístroje, materiál a chemikálie</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Vypracování chromatografických podmínek pro HPLC analýzu perindoprilu a indapamidu</b>	<b>40</b>
<b>5. Výsledky a diskuse</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Chromatografické podmínky pro HPLC analýzu perindoprilu a indapamidu</b>	<b>51</b>
<b>5.2 Stanovení obsahu</b>	<b>56</b>
<b>6. Závěr</b>	<b>65</b>
<b>7. Literatura</b>	<b>66</b>

# 1. Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejmodernějších a nejprogresivněji se rozvíjejících separačních metod, nachází široké uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Tato metoda je založena na rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Jednou z výhod HPLC je, že umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní hodnocení analyzovaných látek. K dalším přednostem vysokoúčinné kapalinové chromatografie patří rychlost analýzy, malé množství vzorku potřebné pro analýzu, velká citlivost a automatizace.

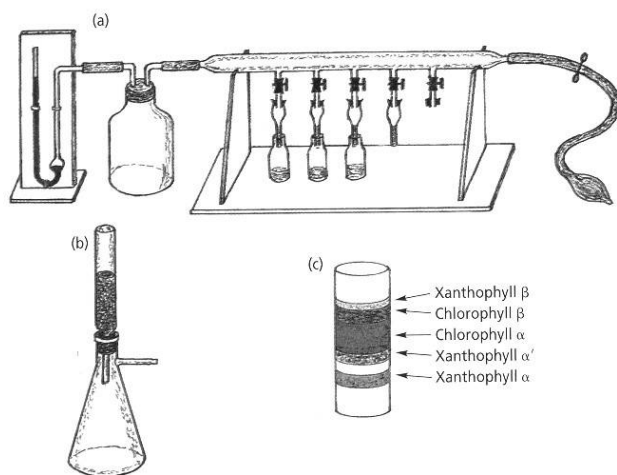
Současné trendy v oblasti HPLC vedou k miniaturizaci celého separačního systému s důrazem na automatizaci, urychlení analýzy, zlepšení citlivosti a životnosti kolon.

Perindopril a indapamid jsou léčiva působící proti vysokému krevnímu tlaku různými mechanismy účinku, perindopril působí jako inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu a indapamid je diuretikum. Tato kombinace vede k posílení antihypertenzního účinku, tudíž lze užít nižší dávky než při monoterapii, čímž dochází ke snížení nežádoucích účinků a v neposlední řadě i ke zlepšení compliance pacienta.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Chromatografické metody

#### 2.1.1 Historie:



Za objevitele chromatografie je považován ruský botanik Cvět, který počátkem minulého století rozdělil listová barviva na sloupci sorbentu. K separaci směsi rostlinných pigmentů využil adsorpčních dějů na koloně s uhličitanem vápenatým a po prolití petroletherem získal

Obr. č. 1: První kapalinový chromatograf sestavený Cvětem v roce 1903 <sup>(1)</sup>

oddělené barevné zóny jednotlivých složek. Z jeho práce jsou odvozeny ostatní chromatografické metody, které se začaly s postupem času objevovat. Později byl dán základ chromatografii systému plyn-pevná látka, tato separační metoda je založenou na sorpci a desorpci pro látky v plynném stavu, jako první se jí zabýval Hesse. Zásadní význam v rozvoji chromatografie však měla práce Martina a Synga, kteří položili základ chromatografii systému kapalina-kapalina. Oba za tuto práci obdrželi v roce 1952 Nobelovu cenu. <sup>(2,3)</sup>

#### 2.1.2 Definice

Chromatografické metody patří mezi velmi účinné separační metody. Tyto metody jsou velice často používané v analýze léčiv. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody nelze principiálně použít. Chromatografické metody mají v analýze prvořadý význam, protože veškeré technické produkty a velká většina přírodních látek jsou složité směsi.



Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární (nepohyblivá), má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi a druhá je mobilní (pohyblivá), která pak vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází, která je v koloně nebo plošné vrstvě, a mobilní fází, která unáší separované látky. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. <sup>(4,5)</sup>

Tyto interakce dělených látek se stacionární a mobilní fází jsou různé intenzity jak do kvantity, tj. velikosti vzájemně působících sil, tak i do kvality, tj. mechanismů interakcí. K separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi. <sup>(2,4)</sup>

Vzorek se vnáší mezi tyto dvě fáze a je unášen mobilní fází chromatografickou soustavou. Složky vzorku, které lnou ochotněji ke stacionární fázi než k fázi mobilní, se při pohybu zdržují déle než ostatní, které se ke stacionární fázi poutají hůře. Tím se postupně od sebe složky separují. <sup>(6)</sup>

Stacionární fáze může být buď tuhá (sorbent) nebo kapalná, mobilní fáze je kapalná (eluent) nebo plynná (nosný plyn). Hybnou silou analýzy je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Vlastní dělení látek však závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně v závislosti na dělených látkách. <sup>(7)</sup>

Výsledkem separace je chromatogram, který lze získat dvěma způsoby. Buď dělené složky neopustí chromatografický systém a po zjištění jejich polohy (díky vyvolání barevných pásů nebo skvrn) se vytvoří tzv. vnitřní chromatogram, nebo jednotlivé složky opouštějí chromatografický systém v různém čase, tento signál je zaznamenán detektorem a pomocí zapisovače lze získat tzv. vnější chromatogram. <sup>(8)</sup>

### 2.1.3 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek: <sup>(6)</sup>

1. podle charakteru mobilní fáze
2. podle způsobu zavádění vzorku na kolonu
3. podle podstaty separačního procesu

**Chromatografické metody lze rozčlenit podle charakteru mobilní fáze:**

**Plynová chromatografie** – mobilní fází je inertní plyn

Plynová chromatografie je citlivá analytická metoda s velkou separační účinností, je využívána ve všech lékopisech vyspělých zemí. Dnes má však v analýze léčiv menší uplatnění než kapalinová chromatografie. Hlavními výhodami této metody jsou jednoduchost, vysoká citlivost a velmi vysoká separační účinnost. Nevýhodou je, že plynová chromatografie se využívá pro analýzu látek těkavých a látek, které lze zahřátím převést na páry aniž došlo k jejich rozkladu, tudíž není vhodná pro biologicky aktivní makromolekuly a termolabilní látky. Jako mobilní fáze se v plynové chromatografii používá inertní plyn, nejčastěji dusík nebo helium. <sup>(5,6,7)</sup>

Vzorek obsahující dělené látky se vstříkne do vyhřátého prostoru, kde je převeden do plynného stavu, a odtud je unášen proudem nosného plynu do chromatografické kolony, která je umístěna v termostatu. Dělené látky se v koloně sorbují na stacionární fázi a poté se desorbují nosným plynem. Tento proces se mnohonásobně opakuje. Nosný plyn unáší dělené látky z kolony do detektoru, kde se registruje signál odpovídající změnám koncentrace v nosném plynu vystupujícím z kolony. <sup>(9)</sup>

Plynový chromatograf se skládá ze zdroje nosného plynu, jeho regulace a měření tlaku a průtoku, zařízení pro dávkování vzorku, chromatografické kolony umístěné v termostatu, detektoru a systému pro zpracování dat. <sup>(7,10)</sup>

## Kapalinová chromatografie – mobilní fáze je kapalina

Kapalinová chromatografie se dále dělí **podle její realizace** (uspořádání stacionární fáze) :

- **plošné uspořádání** – papírová chromatografie – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru <sup>(6)</sup>

Papírová chromatografie byla objevena roku 1944, což znamenalo nové možnosti detekce, identifikace a separace malých kvant látek. Jejími objeviteli jsou Consden, Gordon, Martin a Synge. <sup>(11)</sup>

Princip: Papírová chromatografie představuje rozdělovací chromatografii v plošném uspořádání. Separace je především založena na postupném rozdělování jednotlivých složek dělené směsi mezi fázi mobilní a fázi stacionární. Na chromatografický papír se vyznačí „start“ a „čelo“ chromatogramu (linie, kterou má mobilní fáze dosáhnout). Na „start“ se nanese roztok analyzovaného vzorku a standardů, po zaschnutí se vloží do chromatografické komory, na jejímž dně je vhodná mobilní fáze, jejímiž parami je komora nasycena. Chromatogram se nechá vyvíjet. Rozpouštědlo postupně prostupuje papírem a přitom rozpouští a různou rychlostí s sebou unáší jednotlivé složky analyzované látky. Na chromatogramu se součásti analyzované látky projeví skvrnami různě vzdálenými od startu. Po určení polohy jednotlivých skvrn detekcí se zjišťuje retenční faktor látky ( $R_F$ ). Poloha jednotlivých skvrn se zjistí detekcí nejčastěji chemickou (postříkem činidlem za vzniku barevného reakčního produktu) nebo fyzikální (fluorescence v UV světle nebo použitím radioaktivních indikátorů). Retenční faktor látky je veličina, která je pro danou látku za konkrétních podmínek charakteristická a slouží k její identifikaci. Hodnota  $R_F$  je poměr vzdálenosti středu skvrny od startu ku vzdálenosti čela mobilní fáze od startu, tudíž velikost  $R_F$  je vždy menší než 1. Tato veličina je výrazně závislá na způsobu provedení, a proto je vždy nutno porovnávat retenční faktor vzorku se standardem, naneseným současně na stejném chromatografickém papíře.

Dnes je papírová chromatografie již překonanou metodou, nicméně ji lze využít jak v kvalitativní analýze, a to ve zkouškách totožnosti a zkouškách na čistotu, tak v kvantitativní analýze.

Instrumentace: Pro chromatografické účely se používá speciální, velmi čistý a stejnorodý filtrační papír. U tohoto papíru je stacionární fáze voda, která je jeho součástí (kolem 5%). <sup>(7,12)</sup>

- tenkovrstvá chromatografie – stacionární fáze je nanесena na skleněné desce, hliníkové folii nebo plochem podkladu z jiného materiálu, jako sorbenty se nejčastěji používají silikagel (oxid křemičitý), oxid hlinitý, křemelina, případně jsou tyto materiály dále upraveny vhodnou impregnací.

Tenkovrstvá chromatografie se k identifikaci léčiv v lékopisech využívá velmi často. Velkou výhodou tohoto typu chromatografie je jednoduchost provedení analýzy a dostupnost příslušného laboratorního vybavení.

Provedení chromatografie na tenké vrstvě, včetně kvalitativního i kvantitativního vyhodnocení, je obdobná jako u papírové chromatografie. <sup>(6,7)</sup>

- **kolonové uspořádání** – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně) <sup>(6)</sup>

Principy a možnosti kolonové chromatografie byly známy již od Cvětova objevu chromatografie, ale podstatný rozvoj této chromatografické metody umožnil teprve až vývoj moderní instrumentace. Až poté bylo dosaženo reprodukovatelných průtoků mobilní fáze procházejících kolonami, které snesou vysoký tlak. Po vyvinutí citlivých detektorů a přípravě náplní kolon s definovanými a velmi malými rozměry částecек, bylo teprve možné mluvit o vysokoúčinné kapalinové chromatografii. <sup>(13)</sup>

### **Podle způsobu zavádění vzorku na kolonu rozlišujeme:**

#### Frontální chromatografie

Při frontální chromatografii se nepoužívá žádné vyvíjecí činidlo, na kolonu se kontinuálně zavádí analyzovaná směs, tj. vzorek rozpuštěn v mobilní fázi. Při tomto typu chromatografie se nejméně sorbuje rozpouštědlo, tudíž opouští kolonu jako první. Je následováno ostatními složkami roztoku podle jejich různé disociační konstanty tak, že nejdříve vycházejí složky nejslaběji sorbované.

Frontální analýzu lze použít k čištění látek, ale její nevýhodou je, že lze izolovat pouze jednu složku směsi. <sup>(8,14)</sup>

#### Vytěšňovací chromatografie

Při vytěšňovací chromatografii se vzorek zavádí na kolonu diskontinuálně a využívá se mobilní fáze se silnějšími sorpčními vlastnostmi vůči stacionární fázi než mají složky vzorku. Takže tyto komponenty jsou úplně vytěšňovány ze stacionární fáze a vycházejí z kolony před silně se sorbujícími složkami mobilní fáze. <sup>(14,15)</sup>

Tyto dvě zmíněné techniky se v praxi používají jen minimálně, praktický význam má výhradně eluční chromatografie. <sup>(15)</sup>

### Eluční chromatografie

Při eluční chromatografii jsou složky vzorku silněji sorbovány v koloně než složky mobilní fáze. Jednotlivé součásti obsažené ve vzorku jsou eluovány z kolony v pořadí velikosti sorpce na stacionární fázi a jsou mezi sebou odděleny čistou mobilní fází. <sup>(2)</sup>

Eluci chromatografického systému je možné realizovat několika způsoby:

- *izokratická eluce* – vzorek se promývá mobilní fází o stále stejném složení dokud nedojde k oddělení jednotlivých složek a získání jednotlivých separovaných složek roztoku
- *vícestupňová eluce* – nejprve dochází k promývání systému méně polárním rozpouštědlem, kdy se eluují některé složky, ostatní, které jsou příliš sorbovány, se vymyjí rozpouštědlem polárnějším
- *gradientová eluce* – v chromatografickém systému se plynule mění pH nebo iontová síla, resp. koncentrace polárnější složky v mobilní fázi <sup>(7)</sup>

### **Chromatografické metody lze rozčlenit podle podstaty separačního procesu:**

#### **Adsorpční chromatografie**

Podstatou separace při adsorpční chromatografii je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch adsorbentu. Mezi nejčastěji používané adsorbenty patří oxid hlinitý, hořečnatý, silikagel, práškovaná celulóza nebo aktivní uhlí. <sup>(4,5)</sup>

Pohyblivou fází tvoří rozpouštědla buď čistá nebo ve směsi. Po vnesení vzorku se systém promývá mobilní fází. Nejprve opouští kolonu látka nejméně adsorbovaná, poté postupně složky silněji adsorbované. <sup>(7)</sup>

Adsorpční chromatografie může být jak plynová (v mezifázi plyn - tuhá látka), tak i kapalinová (v mezifázi kapalina - tuhá látka) a zaujímá velký význam mezi ostatními chromatografickými metodami. Je to způsobeno především vývojem adsorbentu s dostatečně homogenním povrchem pro plynovou i pro kapalinovou chromatografii a

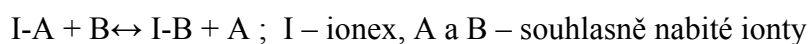
rozvojem přístrojové techniky, zejména vysoce citlivých detektorů a kapalinových chromatografů s možností využití vysokých tlaků na vstupu do kolony pro metodu HPLC. Adsorpční chromatografie je obzvláště vhodná pro separaci látek, které podle svých funkčních skupin náleží k odlišným chemickým skupinám. Naopak obtížně budou separovány látky, které mají v podstatě stejnou polaritu a liší se pouze v alifatických substituentech. <sup>(16,17)</sup>

### **Rozdělovací chromatografie**

V rozdělovací chromatografii o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina, plyn). Chromatografická kolona je naplněna inertním nosičem (silikagel, křemelina, silikáty, celulóza), na jehož povrchu je zakotvena účinná stacionární kapalná fáze. Po vnesení vzorku dělené směsi do systému dochází při promytí mobilní fází (organické rozpouštědlo nemísitelné se stacionární fází) k opakovanému rozdělování součástí směsi mezi obě kapalnou fáze, při plynové chromatografii mezi kapalnou a plynou fází. <sup>(5,6)</sup>

### **Iontově výměnná chromatografie**

Iontově výměnnou chromatografii lze realizovat jen jako kapalinovou chromatografii. Jako stacionární fáze jsou používány iontoměniče (katexy a anexy). <sup>(4)</sup> Měníče iontů jsou nerozpustné látky, které při styku s vodnými roztoky bobtnají a umožňují uvolnění iontů. Tyto disociované ionty pak mohou být nahrazeny ionty přítomnými v roztoku, které mají k měniči větší afinitu. Tento proces lze popsat rovnicí:



Průběh této reakce není závislý jen na afinitě iontů k měniči, ale především na jejich koncentraci. I když iont B má k měniči I větší afinitu, může být zpětně vytěsněn iontem A, jestliže se koncentrace tohoto iontu v roztoku výrazně zvýší.

Iontoměníče lze dělit z několika hledisek:

- rozdělení podle jejich původu
- rozdělení podle chemického složení matrice
- rozdělení podle ionogenních skupin
- rozdělení podle tvaru a skupenství

#### rozdělení podle původu:

Ionexy jsou podle původu děleny na přírodní a syntetické.

#### rozdělení podle chemického složení matrice:

Struktura, která nese ionogenní skupiny, může být anorganická nebo organická.

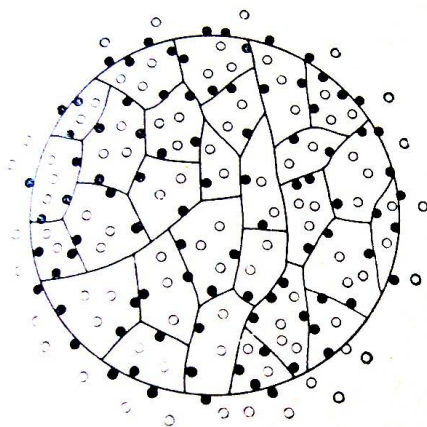
Anorganické ionexy včleňují ionty do krystalových nebo semikrystalových mřížek různé struktury. Organické polymerní ionexy jsou tvořeny převážně polymerními příčně zesíťnými řetězci nesoucími v nepravidelných intervalech ionogenní skupiny.

#### rozdělení podle ionogenních skupin:

Ionexy, které uvolňují a vyměňují kationy, se označují jako měniče kationů neboli katexy, na nosiči jsou vázány kyselé skupiny, jsou to v podstatě nerozpustné polymerní polyvalentní kyseliny.

Měníče anionů neboli anexy uvolňují a vyměňují aniony, na nosiči jsou vázány bazické skupiny.

#### rozdělení podle tvaru a skupenství:

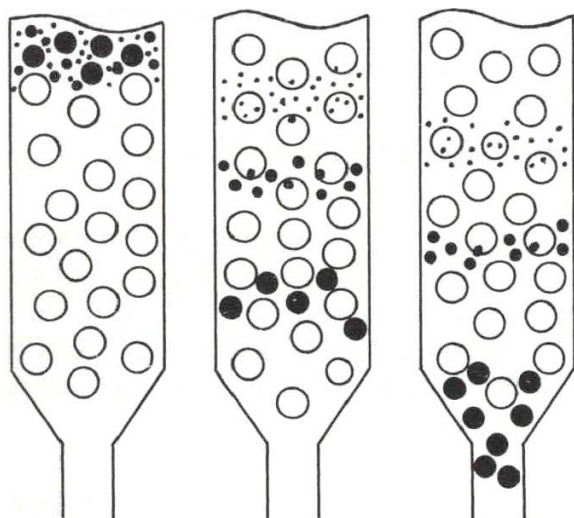


Většina ionexů jsou tuhé látky, ale byly též připraveny kapalné ionexy, které jsou určeny k užití ve speciálních případech. Tuhé ionexy se k chromatografii užívají většinou ve formě zrněk nebo perel. Dále se však také vyrábějí ve formě membrán, trubic, kapilár, vláken, tkanin nebo aplikace ve formě tenkých vrstev na povrchu mikroskopických kuliček, které mají inertní jádro.  
(18,19)

Obr. č. 2: Struktura organického kulovitého ionexu<sup>(18)</sup>

Jako mobilní fáze se při tomto typu chromatografie používají roztoky solí či pufrů (méně často kyselin nebo zásad) rozpuštěné ve vodě nebo ve smíšených vodně-organických rozpouštědlech.<sup>(20)</sup>

### **gelová chromatografie**



Během gelové chromatografie jsou analyzované látky separovány na základě velikosti a tvaru molekul. Slouží ke stanovení relativních molekulárních hmotností. Vzorek látky je unášen protékající mobilní fází kolonou, naplněnou porézním inertním materiálem (gelem), přičemž proniká do rozpouštědlem naplněných pórů gelu. Malé

Obr. č. 3: Separace molekul ve stacionární fázi při gelové chromatografii<sup>(21)</sup>

molekuly pronikají do pórů všech velikostí, tudíž se v chromatografickém systému zdrží déle, zatímco větší molekuly projdou jen do větších pórů a velké molekuly, které přesahují průměr pórů, vycházejí z kolony bez jakéhokoliv zdržení. Separace molekul je tedy závislá i na rozmezí velikosti pórů zvoleného gelu a prakticky vůbec nezávisí na jejich chemické povaze. Chemické vlastnosti separovaných látek rozhodují pouze o tom, v jakém systému bude separace prováděna (hydrofilní/hydrofobní gel s použitím vhodných rozpouštědel).<sup>(4,13)</sup>

Jako gely se používají různé typy přírodních nebo syntetických látek s krystalickou strukturou, tvořené systémem kanálků a pórů. Matrice gelu musí být inertní k analyzovaným látkám i k mobilní fázi, a to i při použití v kyselém i zásaditém prostředí. Gel dále musí odolávat zvýšeným pracovním teplotám a nesmí se během separace rozkládat, ani uvolňovat rozkladné produkty.

Gely používané v chromatografii lze rozdělit na xerogely, ty jsou tvořené makromolekulami s póry určité velikosti, v rozpouštědle bobtnají a mnohonásobně zvětšují svůj objem, a aerogely, které na rozdíl od xerogelů mají matici s pevnou inertní strukturou, jež obsahuje póry určité velikosti, které jsou vyplněny vzduchem, při naplnění kolony nedochází k objemovým změnám, rozpouštědlo pouze vytěsňuje vzduch



z pórů gelu, přičemž matrice nebobtná. Dále se používají gely, které mají vlastnosti obou gelů, nazývané hybridní nebo též homogenní. Mají pevnou matici tvořenou hustě zesíťným polymerem s velkým množstvím makropórů i mikropórů. Tyto gely umožňují práci i za použití vyšších tlaků.

Gely lze také dělit podle afinity k vodě, tj. na hydrofilní (dextranové, polyakrylamidové, hydroxyalkylmethakrylátové, agarózové gely) a hydrofóbní (polystyrenové, polyvinylacetátové gely). Existují však i univerzální gely (pórovitá skla), které mohou být použity jak ve vodném prostředí, tak i v prostředí organických rozpouštědel. Výběr mobilní fáze však nehraje tak důležitou roli jako při jiných chromatografických metodách.

Metoda je nejvíce využívána v biochemii při separaci polypeptidů a bílkovin, kvůli čemuž byla původně vyvinuta. <sup>(13,22,23)</sup>

### **Afinitní chromatografie**

Při afinitní chromatografii se využívá specifické interakce mezi proteinem a ligandem. Ligand se naváže na inertní nerozpustný nosič, kterým se pak naplní chromatografická kolona. Takto naplněný sloupec zadržuje pouze takové proteiny, které mají dostatečnou afinitu k ligandu, ostatní kolonou pouze projdou. Specificky adsorbovaný protein se pak eluuje při změně složení mobilní fáze tak, aby došlo k disociaci. Afinitní chromatografii lze uplatnit všude tam, kde ligand specificky interaguje s biomolekulou.

Mezi požadavky na nosič patří jeho nerozpustnost v použitých rozpouštědlech, dostatečná permeabilita a specifický povrch, musí být chemicky a mechanicky stabilní a hydrofilní. Jako nosiče se nejčastěji používají agaróza, organické polymery nebo nosiče na bázi silikagelu.

Specifické adsorbenty lze použít v případě čištění proteinů, koncentraci zředěných roztoků proteinů, oddělení denaturované formy proteinů od aktivní. <sup>(24,25)</sup>

## 2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), je v současné době jednou z nejprogresivněji se rozvíjejících analytických metod, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. HPLC je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích. Cílem HPLC je rozdělit složky vzorku v přijatelném čase tak, aby přicházely do detektoru jako samostatné zóny s gaussovským rozdělením koncentrací. <sup>(4,26)</sup>

Hlavní výhody HPLC:

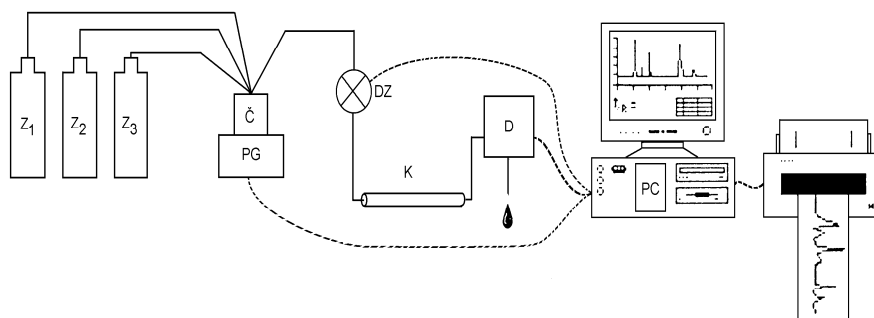
Jedná se o separační metodu, která umožňuje současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, a to s vysokou selektivitou, citlivostí a v relativně krátkém čase. Analýzu lze provést i s velmi malým množstvím vzorku. Při rutinním použití (velké série vzorků) je možno využít automatický dávkovač pro plné automatizování metody.

Pro úspěšnou HPLC analýzu je nutná optimalizace chromatografických podmínek tak, aby jednotlivé separované složky směsi poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky, které jsou rozdělené až na základní linii. <sup>(4,27)</sup>

### 2.2.1 Instrumentace v HPLC

Z technického hlediska může být chromatograf konstruován jako modulární (stavebnicový) a nebo kompaktní (skříňový). Každé z těchto řešení má své výhody i nevýhody. Předností modulární soustavy je možnost flexibilní přestavby, připojení dalších přídatných zařízení, snadnější přístup při opravách a možnost inovace systému po částech. Nevýhodou je především dlouhé kapilární propojení a v některých případech inkompatibilita systémů. Kompaktní systém je charakterizován fixním uspořádáním jednotlivých součástí chromatografu. Výhodou jsou krátké kapilární spoje, nevýhodou zhoršená servisní přístupnost. <sup>(28)</sup>

Kapalinový chromatograf se skládá ze součástí, které umožňují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci. <sup>(13)</sup>



Obr. č. 4: Schéma kapalinového chromatografu <sup>(4)</sup>

$Z_1, Z_2, Z_3$  - zásobníky mobilní fáze

Č – vysokotlaké čerpadlo, které konstantní průtokovou rychlostí tlačí mobilní fázi nastaveného složení přes kolonu do detektoru

PG – programovací jednotka, pomocí které se nastavuje požadované složení mobilní fáze

DZ – dávkovací zařízení

K – chromatografická kolona

D – detektor, který indikuje průtok separované složky detekční celou a přenáší vhodně upravený signál do počítače PC, který ho zpracuje

### **Zásobníky mobilní fáze**

Zásobníky mobilní fáze bývají skleněné, plastové (nejčastěji z polyethylenu, polypropylenu, polytetrafluorethylenu) nebo nerezové nádoby. Zásobníky musí být dobře uzavřeny, ale tak, aby z nich mohla kapalina dobře odtékat a zároveň přitom neunikaly do okolí její páry. Celý systém musí být odolný proti korozi. <sup>(13,29)</sup>

Mobilní fáze hraje v kapalinové chromatografii neméně důležitou roli než stacionární fáze. Neměla by mít příliš velkou viskozitu, aby nekladla odpor proti průtoku hmoty kolonou při určitém tlaku dostatečnou rychlostí. Mobilní fáze by neměla chemicky narušovat nebo vymývat stacionární fázi. <sup>(6)</sup>

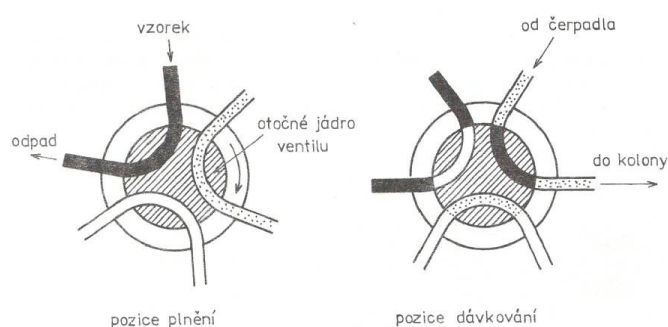
### **Čerpadla mobilní fáze**

Vysokotlaká čerpadla můžeme dělit do dvou skupin. Oba typy pracují tak, že ze zásobníku vytlačují pístem či membránou mobilní fázi.

Čerpadla jsou rozdělována na pulsni a bezpulsni. Pulsni čerpadla mají poměrně malý objem pracovní komory a k dosažení potřebného průtoku musí dojít k mnohokrát opakovanému stlačení a vypuzení mobilní fáze z pracovní komory. Zatímco bezpulsni čerpadla pracují s velkým objemem pracovní komory, což umožňuje provést celou řadu analýz bez obnovy náplně. Bepulsni čerpadla ve srovnání s čerpadly pulsni nevyžadují speciální přídavné zařízení pro tlumení tlakových pulsů. Zcela samostatným typem čerpadel jsou tzv. hydraulické pumpy.<sup>(2,12)</sup>

### Dávkovací zařízení

Vzorek se před chromatografickým dělením nejprve rozpustí ve vhodném rozpouštědle, nejlépe v mobilní fázi, a dává se na kolonu pomocí injekční stříkačky, dávkovacích ventilů a dnes hlavně pomocí automatických dávkovačů. Při dávkování vzorku je potřeba překonat vysoké tlaky na koloně.<sup>(13,28)</sup>



Obr. č. 5: Schéma dávkovacího ventilu<sup>(28)</sup>

### Chromatografické kolony a jejich náplně

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii má volba a výběr kolon rozhodující význam. Účinnost kolony závisí nejen na kvalitě použitého sorbentu, ale i na délce kolony, na jejím tvaru, na materiálu, ze kterého je zhotovena, jejím vnitřním povrchu a spojovacích součástech.<sup>(13)</sup>

#### Materiál na výrobu kolon:

Chromatografické kolony se nejčastěji vyrábějí z kovů, především z nerezové oceli. Dalším materiálem pro výrobu kolon je sklo. Skleněné kolony se však hodí pouze pro nižší pracovní tlaky (do 10MPa). Nejvhodnější jsou tlustostěnné kolony z borosilikátového skla, které odolávají i silně kyselým roztokům. Další variantou jsou kolony vyrobené z kovu, jejichž vnitřní povrch je potažen tenkou vrstvou skla. Ty

spojují dobré vlastnosti a mechanickou odolnost kovových kolon s chemickou odolností skleněných kolon. <sup>(13)</sup>

#### Typy náplní kolon:

V kapalinové chromatografii se používá mnoho typů stacionárních fází, jejich kvalita (velikost, tvar, porozita, stejnoměrnost a struktura) má hlavní podíl na kvalitě separace. <sup>(7)</sup>

#### Stacionární fáze na bázi silikagelu:

Tato stacionární fáze je stabilní pouze v rozmezí pH 2-7, do teplot kolem 60°C a mechanicky odolná do tlaku 40 MPa.

HPLC s normálními fázemi – chromatografický systém má polární stacionární fázi a méně polární mobilní fázi. Stacionární fázi tvoří buď nemodifikovaný silikagel nebo silikagel modifikovaný CN a NH<sub>2</sub> skupinami, navázané fáze umožňují vyšší reprodukovatelnost retenčních časů.

HPLC s reverzními fázemi – chromatografický systém má sníženou polaritu stacionární fáze a polární mobilní fázi. Stacionární fázi tvoří silikagel modifikovaný alkylovými skupinami. <sup>(30,31,32)</sup>

#### Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého:

Na povrchu oxidu zirkoničitého jsou tři reaktivní místa, proto je nutno tuto stacionární fázi puffrovat. Nespornou výhodou této stacionární fáze je její stabilita v celém rozsahu pH (1-14), díky čemuž má dlouhou životnost. Teplotní stabilita kolony (do 200°C) umožňuje rychlejší analýzu.

#### Polymerní stacionární fáze:

Makroporézní struktura polymerní fáze vykazuje velký adsorpční povrch, stabilitu v celém rozmezí pH a také vysokou teplotní stabilitu (do 200°C). Není však moc mechanicky odolná, maximálním pracovním tlakem na koloně je 20 MPa. Další nevýhodou je závislost její účinnosti na organické složce mobilní fáze. Pro jejich nízkou účinnost nejsou široce rozšířeny, i přestože současně vyráběné polymerní fáze jsou dostatečně mechanicky i chemicky stálé.

Hybridní stacionární fáze:

1.generace: Stabilita těchto stacionárních fází je dána kombinací silikagelu a polymerního materiálu. Stabilita kolony je v rozmezí pH 1-12, teploty do 100°C a tlaků do 40 MPa.

2.generace: Tyto kolony mají ještě vyšší mechanickou stabilitu díky ethylenovým můstkům, tzv. bridged ethyl/siloxane silica hybrid technologie. Jsou stabilní v rozmezí pH 1-12 a při tlaku až 100 MPa. Velikost částic je 1,7  $\mu\text{m}$ .

Stacionární fáze na bázi porézního grafitického karbonu:

Porézní grafitický karbon je vysoce inertní materiál. Je velmi stabilní v širokém rozmezí pH i teplot.

Monolitické stacionární fáze:

Monolitické kolony se vyznačují naprosto odlišnou strukturou v porovnání s konvenčními stacionárními fázemi. Náplň kolony není tvořena částicemi, ale jedním kusem monolitního porézního materiálu. Obsahuje jak větší póry (1-2  $\mu\text{m}$ ), tzv. makropóry, díky nimž je odpor kolony velmi malý a umožňuje použití vyšších průtoků mobilních fází bez negativního zvýšení zpětného tlaku, tak i menší póry (12 nm), tzv. mezopóry, které zvětšují účinný povrch sorbentu pro separaci, a tím umožňují velmi dobrou separační účinnost.

Stacionární fáze pro HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography):

HILIC je jedním z nových trendů v kapalinové chromatografii. Látky jsou separovány s využitím převážně organické mobilní fáze. Voda v ní přítomná vytváří vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a přitom umožňuje rozdělování mezi mobilní fází a vodnou vrstvou.<sup>(30)</sup>

#### Rozměry kolon:

Chromatografické kolony pro HPLC jsou trubice dlouhé 2 - 25 cm (nejčastěji 15 cm) o vnitřním průměru 2 – 8 mm (nejčastěji 4,6 mm) naplněné stacionární fází.

Délka kolony je závislá na materiálu, kterým je kolona naplněna. Čím jsou částice zrnění sorbentu menší, tím je kolona kratší. A čím je kolona kratší, tím je pravděpodobnější, že je kvalitně naplněna.

Kolony se často umisťují do termostátů, které umožňují separaci za zvýšených teplot.<sup>(7,13)</sup>

Na nově vyvíjené analytické kolony jsou kladeny následující požadavky: vysoká chemická stabilita (pH), mechanická stabilita (tlak), možnost využití 100 % vodných mobilních fází, což zvyšuje odolnost a životnost kolon. Dochází ke zkracování a zužování kolon, kvůli rychlejší a citlivější analýze, zmenšování částic, pro účinnější analýzu.<sup>(23)</sup>

## **Detektory**

Detektory se v chromatografii používají k indikaci látek vycházejících z kolony. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu a signál se přivádí přes zesilovač do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. K detekci separovaných látek se obvykle využívá jejich vlastností, kterými se tyto látky liší od složek mobilní fáze.

Na detektory se kladou zejména tyto požadavky:

- linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací; znamená přímou úměrnost hodnot odezvy detektoru v závislosti na koncentraci separované látky
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku
- možnost užít gradientovou eluci

Detektor, který by splňoval všechny uvedené požadavky, v podstatě neexistuje. Nejčastějším kritériem, podle kterého se detektory rozdělují, jsou měřené veličiny.

Dále lze detektory dělit na univerzální a selektivní.<sup>(13)</sup>

### Spektrofotometrické detektory

(minimální detekovatelná koncentrace  $10^{-10}$  g/ml)<sup>(28)</sup>

Spektrofotometrické detektory patří mezi nejčastěji používané detektory. Detekce probíhá tak, že dochází k proměření absorbance elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami roztoku vzorku a mobilní fáze protékajících celou detektorem. K detekci léčiv se využívá především UV oblasti spektra. Tyto detektory jsou vysoce citlivé.

Nejužívanější UV detektory:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou
- UV/VIS detektor s proměnnou (nastavitelnou) vlnovou délkou
- Scanning UV detektor – snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva
- Diode array detektor – řízený počítačem, snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách, funguje na základě porovnávání poměrů absorbancí, výsledkem je 3D chromatogram jako závislost absorpce na vlnové délce na čase. <sup>(4,26)</sup>

#### Fluorimetrické detektory

(minimální detekovatelná koncentrace  $10^{-9} - 10^{-15}$  g/ml) <sup>(28)</sup>

Tyto detektory lze použít v případech, kde analyzované léčivo vykazuje fluorescenci. Látky, které nefluoreskují, lze často pomocí vhodných činidel převést na fluoreskující deriváty. Podstatou této detekce je schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Fluorimetrické detektory jsou tedy méně univerzální než UV detektory. <sup>(4,6)</sup>

#### Elektrochemické detektory

(minimální detekovatelná koncentrace  $10^{-7} - 10^{-10}$  g/ml) <sup>(28)</sup>

Elektrochemické detektory se uplatňují při hodnocení látek, u nichž lze využít dějů, souvisejících s elektrochemickou reakcí probíhající na rozhraní elektroda – eluent. Detekce je založena na měření elektrochemických veličin, jejichž hodnota je závislá na koncentraci analyzované látky. Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti látek využívá voltmetrický, ampermetrický a polarografický detektor. <sup>(4)</sup>

#### Refraktometrické detektory

(minimální detekovatelná koncentrace  $10^{-7}$  g/ml) <sup>(28)</sup>

Refraktometrické detektory měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a mobilní fází vytékající z kolony, obsahující analyzovanou látkou. Jsou prakticky univerzální, ale při analytickém hodnocení léčiv se používají ojediněle pro poměrně malou citlivost a nutnost termostatování. <sup>(4)</sup>



### Radiometrické detektory

Radiometrické detektory fungují na principu měření radioaktivity tam, kde kolonu opouštějí radioaktivní látky, jejich aktivitu lze měřit přímo. <sup>(13)</sup>

### Evaporative light scattering detektory

(minimální detekovatelná koncentrace  $10^{-8}$  g/ml)

Slouží především k detekci látek, které ve své molekule neobsahují žádný chromofor nebo fluorofor, jedná se v podstatě o univerzální detektor. Detekce probíhá ve třech fázích.

1.fáze: nebulizace

V nebulizéru je kapalina vytékající z kolony spolu s plynným dusíkem protlačena pod vysokým tlakem přes jehlu do evaporační komůrky za vzniku disperze kapiček. Velikost a uniformita kapiček mají zásadní vliv na citlivost detekce a její reprodukovatelnost.

2.fáze: odpaření mobilní fáze

Z nebulizéru jsou vytlačeny kapičky do vyhřívané unášecí trubice, kde dochází k odpaření mobilní fáze. Výsledkem je mlha tvořená částicemi suchého vzorku a parami mobilní fáze.

3.fáze: detekce

Na závěr jsou částice vzorku vneseny do detekční cely, kde se střetnou s paprskem emitovaným laserovou diodou. Částicemi rozptýlené světlo je poté detekováno křemíkovou fotodiodou generující elektrický signál, který je po zesílení dále elektricky zpracován. <sup>(30)</sup>

### Charged aerosol detektory

(minimální detekovatelná koncentrace  $10^{-6} - 10^{-9}$  g/ml)

Jedná se o univerzální detektor, který funguje na obdobném principu jako hmotnostní spektrometr s chemickou ionizací za atmosférického tlaku.

Mobilní fáze se vzorkem je nejprve převedena do formy aerosolu proudem dusíku (nebulizace). Kapky mobilní fáze jsou vysušeny, takže se získají jen částičky analytu. Ty jsou smíchány se sekundárním proudem dusíku a při průchodu vysokonapětovým koronárním výbojem na platinovém drátku získávají pozitivní náboj úměrný své velikosti. Vzniká tak nabitý aerosol, následuje detekce a zpracování signálu, který je přímo úměrný množství analytu. <sup>(30)</sup>

### Hmotnostní spektrometry

Po výstupu z HPLC kolony je nutno oddělit mobilní fázi od vzorku. Molekuly látky jsou převedeny do plynného stavu v hmotnostním spektrometru, kde jsou ionizovány nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací. Nabité částice jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a je zaznamenáno hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru hmotnost/poměr nábojů). Spojení HPLC – MS je vysoce selektivní a vysoce citlivé. <sup>(4)</sup>

### **Zařízení pro zpracování dat**

Při chromatografické separaci látek přecházejí jednotlivé složky z kolony kontinuálně do detektoru. Odtud vychází analogový signál v závislosti na okamžité koncentraci roztoku, který prochází detektorem, a tento signál je veden k zapisovači. Grafický záznam průchodu jednotlivých komponent detektorem v závislosti na čase je reprodukován ve tvaru píků na chromatogramu. Tvar píků se v ideálním případě blíží Gaussově křivce, přičemž plocha píku je přímo úměrná množství látky prošlé detektorem. K vyhodnocování a zpracování chromatografických dat se používají počítače se speciálním softwarem. Kromě zpracování dat počítač řídí celou analýzu, automaticky kontrolují zda jsou dodrženy nastavené parametry jako jsou složení a průtok mobilní fáze, objem a četnost dávkování vzorku, termostatovaná teplota na koloně a nastavení detektoru, a automaticky zasahují do procesu při porušení předem daných podmínek. <sup>(28,29)</sup>

## **2.2.2 Hodnocení HPLC chromatogramu**

### Kvalitativní hodnocení:

Při kvalitativní analýze jde o určení počtu komponent v analyzované směsi a identifikace všech významných látek, které byly chromatografickou separací rozděleny. <sup>(26)</sup> Tato identifikace probíhá na základě získaných elučních dat jednotlivých komponent vzorku, dat standardních látek a jejich vzájemným porovnáním. K těmto účelům identifikace se využívá retenčních charakteristik.

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční čas, tj. čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Tudíž důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. <sup>(2,4)</sup>

### Kvantitativní hodnocení:

Kvantitativní analýza je dána plochou píku (eventuálně jeho výškou), ta roste s obsahem složky ve vzorku. Výšku píku lze snadněji změřit, ale je mnohem více ovlivnitelná malými změnami podmínek při průběhu stanovení. Díky zjištěným plochám píků lze při porovnání se standardy zjistit obsah dané látky ve vzorku. <sup>(6)</sup>

Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají tyto dvě metody:

- **metoda vnějšího standardu:**

Tato metoda spočívá ve dvojím dávkování. Nejprve se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram. Jako vnější standard se obvykle používá u substancí standard stanovované látky, označovaný CRL (chemická referenční látka), nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.

- **metoda vnitřního standardu:**

Při této metodě se ke známému objemu roztoku vzorku přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se vypočítá z poměru ploch píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standart by měl být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, měl by mít podobnou koncentraci a pokud možno i strukturu jako látky, jejichž obsah je zjišťován a musí být chemicky inertní. <sup>(27)</sup>

## 2.3 Vlastnosti zkoumaných látek

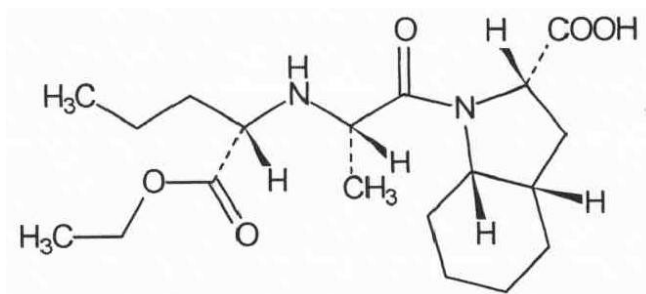
### 2.3.1 Perindopril

#### 2.3.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

**Název:** Perindoprilum argininum (není lékopisný)

Synonymum: Perindopril - arginin

**Strukturní vzorec:**



perindopril

**Sumární vzorec:** Perindopril: C<sub>19</sub> H<sub>32</sub> N<sub>2</sub> O<sub>5</sub>

Perindopril - arginin: C<sub>26</sub> H<sub>46</sub> N<sub>6</sub> O<sub>7</sub>

**Chemický název perindoprilu:**

(2S,3aS,7aS)-1-[(2S)-2-{[(2S)-1-ethoxy-1-oxopentan-2-yl]amino}propanoyl]-2,3,3a,4,5,6,7,7a-oktahydroindol-2-karboxylová kyselina

**Mr** = 368,5 (perindopril)

**Mr** = 542,70 (perindopril - arginin)

Perindopril - arginin je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek se slabě hygroskopickými vlastnostmi. Snadno se rozpouští ve vodě a ethanolu (96%) a mírně je rozpustný v dichlormethanolu.

Perindopril - arginin je polymorfní látka, tzn. má schopnost vyskytovat se v pevném stavu v různých krystalických formách při stejném chemickém složení.<sup>(33)</sup>

### **2.3.1.2 Farmakologické vlastnosti**

#### **Klinické údaje:**

##### Indikace:

Perindopril se používá k léčbě arteriální hypertenze a srdečního selhání. Snižuje rizika kardiálních příhod u pacientů s prodělaným infarktem myokardu a působí jako prevence recidivy cévní mozkové příhody.

Perindopril může být používán v monoterapii nebo v kombinaci s dalšími druhy antihypertenziv. Jeho bezpečnost, účinnost a velmi dobrá tolerance byla ověřena v mortalitních studiích EUROPA a PROGRESS, které prokázaly, že perindopril snižuje výskyt kardiovaskulárních příhod u širokého spektra nemocných s vaskulárním onemocněním. <sup>(35,36)</sup>

##### Dávkování a způsob podání:

Perindopril, dlouhodobě působící lipofilní inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE), se doporučuje užívat jednou denně (4-5 mg), a to nejlépe ráno před jídlem. <sup>(35)</sup>

##### Kontraindikace:

Mezi kontraindikace perindoprilu patří hypersenzitivita na perindopril, angioedém, hypotenze, aortální a mitrální stenóza nebo bilaterální stenóza renální tepny. Dále není vhodné používat perindopril v těhotenství a během kojení. <sup>(35,37)</sup>

##### Nežádoucí účinky:

Užívání perindoprilu může přinést následující nežádoucí účinky (řazené podle systémů, kterých se týkají):

Psychické poruchy: poruchy nálady nebo spánku

Poruchy nervové soustavy: bolesti hlavy, parestézie, závratě

Oční poruchy: poruchy vidění

Ušní poruchy: hučení v uších

Kardiovaskulární poruchy: hypotenze

GIT poruchy: nauzea, zvracení, bolesti břicha, poruchy chuti, zácpa, průjem nebo sucho v ústech

Poruchy kůže: svědění, vyrážka

Poruchy pohybového systému: svalové křeče

Poruchy ledvin a močových cest: renální insuficience

Poruchy reprodukčního systému: impotence <sup>(35)</sup>

### **Farmakodynamické vlastnosti:**

Perindopril patří do farmakoterapeutické skupiny antihypertenziv s ATC kódem C09A A09. <sup>(35)</sup>

Inhibitory ACE lze dělit podle několika hledisek:

Dle chemické struktury ligandu, kterým se inhibitor váže na ACE:

- sulfhydrylová skupina: kaptopril
- karboxylová skupina: **perindopril**, ramipril, quinapril, enalapril, lisinopril
- fosforylová skupina: fosinopril

Vhodnějším dělením pro praxi je však dělení dle farmakologických vlastností:

- léčivá látka absorbující se je aktivní a dále se přeměňuje v metabolit: kaptopril
- neaktivní léčivá látka se aktivuje až po esterifikaci v játrech: **perindopril**, ramipril, spirapril, quinapril, enalapril
- hydrofilní, přímo aktivní a nemetabolizující se léčivá látka: lisinopril

Inhibitory ACE snižují u hypertoniků jak systolický tak i diastolický tlak snížením periferního cévního odporu, který není provázen reflexní tachykardií ani snížením srdečního výdeje. ACEI neovlivňují metabolismus lipidů ani sacharidů, naopak pozitivně ovlivňují inzulínovou rezistenci a zpomalují progresi diabetické neuropatie. <sup>(38)</sup>

Perindopril působí jako inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu, který umožňuje přeměnu angiotenzinu I na angiotenzin II. Konvertující enzym umožňuje přeměnu angiotenzinu I na vazokonstrikční angiotenzin II a zároveň způsobuje rozklad vazodilatačního bradykininu na neúčinný heptapeptid. Inhibicí ACE dochází ke snížení angiotenzinu II v plazmě, což vede ke zvýšení aktivity reninu v plazmě (inhibicí negativní zpětné vazby uvolněním reninu) a snížení sekrece aldosteronu.

Perindopril je prolečivem, po perorální aplikaci se v těle přeměňuje na aktivní metabolit perindoprilát. V lékových formách je obsažen perindopril arginin nebo perindopril erbumin. <sup>(35,36,39)</sup>

### **Farmakokinetické vlastnosti:**

Po perorálním podáním je absorpce perindoprilu rychlá a maximální plazmatické koncentrace je dosaženo během tří až čtyř hodin. Biologická dostupnost je 65-70 %. Zhruba 20 % celkového množství absorbovaného perindoprilu je konvertováno na perindoprilát, účinný metabolit. Kromě tohoto účinného metabolitu má perindopril ještě dalších pět neúčinných metabolitů.

Požítí potravy snižuje přeměnu perindoprilu na perindoprilát, tedy biologickou dostupnost, proto by měl být podáván před jídlem.

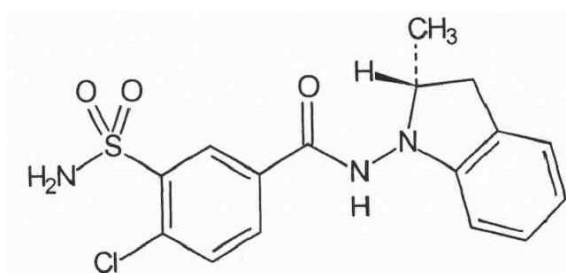
Perindopril je vylučován ledvinami. <sup>(35,37)</sup>

## **2.3.2 Indapamid**

### **2.3.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti**

**Lékopisný název:** Indapamidum

**Strukturní vzorec:**



**Sumární vzorec:** C<sub>16</sub> H<sub>16</sub> Cl N<sub>3</sub> O<sub>3</sub> S

**Chemický název:**

4-chlor-N-[(2RS)-2-methyl-2,3-dihydro-1H-indol-1-yl]-3-sulfamoylbenzamid

**Mr** = 365,83

Indapamid je bílý nebo téměř bílý prášek, je prakticky nerozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v ethanolu (96%).<sup>(33)</sup>

#### **2.3.2.2 Farmakologické vlastnosti**

##### **Klinické údaje:**

###### Indikace:

Terapeutickou indikací indapamidu je arteriální hypertenze.

###### Dávkování a způsob podání:

Doporučené dávkování indapamidu je jedna tableta denně (1,25 mg), zpravidla ráno, a je vhodné ji zapít dostatečným množstvím vody.

###### Kontraindikace:

Indapamid je kontraindikován u hypersenzitivity na indapamid, u závažné renální insuficience, těžkých poruch jaterních funkcí, závažné poruchy elektrolytické rovnováhy a není doporučován v těhotenství a kojení.<sup>(40)</sup>

###### Nežádoucí účinky:

Užívání indapamidu může přinést následující nežádoucí účinky (řazené podle systémů, kterých se týkají):

Poruchy nervové soustavy: únava, parestézie nebo bolest hlavy

GIT poruchy: nauzea, zvracení

Poruchy kůže: vyrážka, purpura

Indapamid se podává v nízkých dávkách, protože vyšší dávkování výrazně zvyšuje výskyt nežádoucích účinků bez současného zvýšení antihypertenzního působení.<sup>(39,40)</sup>



### **Farmakodynamické vlastnosti:**

Indapamid patří do farmakoterapeutické skupiny diuretik s ATC kódem C03B A11. Neovlivňuje metabolismus tuků a sacharidů, má silné antioxidační účinky, proto je vhodný i pro diabetiky a pacienty s hyperlipoproteinemií.

Indapamid působí inhibicí reabsorpce sodíku v distálním tubulu nefronu. Zvyšuje vylučování sodíku a chloridů močí a v menší míře i vylučování draslíku a hořčíku, čímž zvyšuje objem vytvořené moči, tudíž má antihypertenzní účinek. <sup>(37,40)</sup>

### **Farmakokinetické vlastnosti:**

Indapamid se rychle a úplně absorbuje gastrointestinálním traktem. Jeho distribuce probíhá vazbou na plazmatické proteiny (váže se až 79 %). Indapamid se vylučuje převážně močí (70% dávky) a stolicí (22%) v podobě neaktivních metabolitů. <sup>(40)</sup>

Při kombinované léčbě hypertenze je vhodné podávat léčiva s doplňujícím se mechanismem účinku. Tím dochází k posílení antihypertenzního účinku a lze užít nižší dávky. Použití nižší dávky než při monoterapii vede ke zvýšení ochrany cílových orgánů a minimalizaci nežádoucích účinků jednotlivých složek. A v neposlední řadě kombinovaná léčba, podání jedné tablety, zvyšuje compliance pacienta. <sup>(34)</sup>

## 2.4 Přehled prací zabývajících se analýzou perindoprilu a indapamidu

Následující práce se zabývají obdobnými tématy jako tato diplomová práce, tedy hledáním optimálních podmínek pro analýzu kombinace perindoprilu a indapamidu.

- G.Pektaş a E.Dinç analyzovali perindopril a indapamid s použitím reverzní fáze RP-C18, 250 x 4 mm, o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$  a mobilní fáze o složení acetonitril – pufr (fosforečnan sodný 0,1 M okyselený kyselinou fosforečnou na pH 2,12) – voda v poměru 45:45:10 při průtokové rychlosti 2 ml/min. Stanovení probíhalo za laboratorní teploty s využitím diod array detektoru. Jako vnitřní standard byl použit spironolakton.<sup>(42)</sup>

- N.Erk analyzoval kombinaci perindoprilu a indapamidu za následujících podmínek; Byla použita reverzní stacionární fáze RP-YMC-C18 v koloně o rozměrech 150 x 6 mm a velikosti částic 5  $\mu\text{m}$ . Mobilní fáze byla složena z fosfátového pufru o pH 2,4 a acetonitrilu v poměru 70:30 při isokratické eluci s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Analýza probíhala za laboratorní teploty s UV detekcí při vlnové délce 215 nm.<sup>(43)</sup>

- H.Jogia, U.Khandelwal, T.Gandhi, S.Singh a D.Modi se zabývali analýzou kombinovaných tablet perindoprilu a indapamidu. Separace probíhala na stacionární reverzní fázi XTerra RP-C18, 150 x 4,6 mm, o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$  a mobilní fázi složené z pufru (fosforečnanu sodného 0,005M o pH 2) a acetonitrilu v poměru 75:25 o průtokové rychlosti 1 ml/min. Analýza probíhala při teplotě 55°C za využití UV detektoru při vlnové délce 215nm.<sup>(44)</sup>

- A.A.Elshanawane, S.M.Mostafa a M.S.Elgawish vyvinuli podmínky pro současnou analýzu perindoprilu a indapamidu. Jako stacionární fáze byla použita fáze s navázanými CN skupinami, 250 x 4,6 mm, o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$ . Mobilní fáze, o složení methanol – pufr (fosforečnan draselný 10 mM) v poměru 45:55 alkalizovaná hydroxidem sodným na pH 6, protéká rychlostí 1 ml/min. Detekce proběhla na UV detektoru při vlnové délce 210 nm.<sup>(45)</sup>

- M.G.Dewani, K.G.Bothara, A.R.Madgulkar a M.C.Damle analyzovali současně perindopril a indapamid za využití vysokotlaké chromatografie na tenké vrstvě. Jako stacionární fáze byl použit silikagel 60 F<sub>254</sub> a mobilní fáze o složení dichlormethan – methanol – ledová kyselina octová v poměru 95:5:1. Detekce proběhla při vlnové délce 215 nm. <sup>(46)</sup>

Následující práce pojednávají o analýze samotného perindoprilu, indapamidu nebo jejich kombinací s dalšími látkami.

- A.El-Gindy, S.Emara a G.M.Hadad se zabývali analýzou směsi indapamidu a kaptoprilu. Separace probíhala na stacionární fázi RP-C18 a mobilní fázi o složení acetonitril a vodný roztok sodné soli heptansulfonové kyseliny v poměru 60:40 při pH 5,5. Analýza se odehrála za laboratorní teploty při průtokové rychlosti 1 ml/min. <sup>(47)</sup>

- M.C.Damle, D.G.Mohit a B.G.Kailash pracovali na analýze perindoprilu pomocí vysokoúčinné chromatografie na tenké vrstvě. Za stacionární fázi zvolili silikagel 60 F<sub>254</sub> a mobilní fázi o složení dichlormethan – methanol – ledová kyselina octová v poměru 90:8:1. Detekce probíhala při vlnové délce 215nm. <sup>(48)</sup>

- A.I.Patel spolu s kolektivem pracoval na separaci kombinovaných tablet losartanu a perindoprilu. Byla použita kolona o rozměrech 250 x 4,5 mm, naplněna reverzní fází HiQSil – C18 o velikosti částic 5 µm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs acetonitrilu s vodou okyselenou *o*-fosforečnou kyselinou na pH 3,3 v poměru 50:50, průtoková rychlost byla 1 ml/min. Detekce probíhala při vlnové délce 210 nm. <sup>(49)</sup>

- M.Medenica, D.Ivanović, M.Mašković, B.Jančić a A.Malenović se zabývali hodnocením nečistot v tabletách perindoprilu s využitím reverzní (C8) stacionární fáze o velikosti částic 5 µm a rozměry kolony 250 x 4,6mm. Analýza probíhala při teplotě 50°C a průtoku mobilní fáze 1,7 ml/min o složení acetonitril – pufr (fosforečnan draselný 0,05 M okyselený kyselinou *o*-fosforečnou na pH 2,5) v poměru 37:63. <sup>(50)</sup>

• A.B.Chaudhary, R.K.Patel a S.A.Chaudhary se zabývali stanovením kombinovaných tablet losartanu a perindoprilu. Analýza probíhala na reverzní stacionární fázi (C 18) o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$ . Byla použita kolona o rozměrech 250 x 4,6 mm. Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min a její složení acetonitril – okyselená voda (pH 3,4) v poměru 50:50. Detekce proběhla při vlnové délce 218 nm. <sup>(51)</sup>

### **3. Cíl práce**

Cílem diplomové práce bylo nalezení optimálních chromatografických podmínek pro současnou HPLC analýzu perindoprilu a indapamidu a jejich stanovení v kombinovaném léčivém přípravku.

## 4. Experimentální část

### 4.1 Použité přístroje, materiál a chemikálie

#### Přístroje:

Kapalinový chromatograf Hewlett Packard series 1100, HPST, s. r. o., Praha, ČR

Spektrofotometr Shimadzu, UV-2401 PC, Japonsko

Acidimetr 333 Druopta Praha, ČR

Analytické váhy KERN ALS-220-4N, Německo

Ultrazvuková lázeň K 10, Kraitex, Slovensko

Centrifuga IEC CL 31R Multispeed, Thermo Electron Corporation, Francie

#### Chromatografický materiál:

Chromatografická kolona Separon CGC, SGX C<sub>18</sub> 4 x 150 mm, 5 µm, Tessek Ltd., Praha, ČR

Chromatografická kolona Separon CGC, SGX CN 3 x 150 mm, 5 µm, , Tessek Ltd., Praha, ČR

Chromatografická kolona LiChro CART 250-4 LiChrospher 100, RP18, 5 µm, Merck, Německo I

Chromatografická kolona Discovery cyano, 150 x 4,6 mm , 5 µm, Supelco, USA

Chromatografická kolona LiChro CART 250-4 LiChrospher 100, RP18, 5 µm, Merck, Německo II

#### Pomůcky:

Laboratorní sklo

Lžičky

Filtrační papír

## Chemikálie:

Acetanilid, Léčiva, Praha, ČR

Acetonitril, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo

Benetazon, Léčiva Praha, ČR

Klotrimazol, Kraemer + Martin Pharma, Německo

Diklofenak sodná sůl, Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Brno, ČR

Ethylparaben, Fluka, Německo

Fenacetin, Léčiva, Praha, ČR

Fosforečnan amonný, Lachema, Brno, ČR

Chloramfenikol, Galenická laboratoř OSTRAVA, ČR

4' - chloracetanilid, Aldrich Chem.Co, Německo

Indapamid, Sigma – Aldrich Chemie, Německo

Jodid draselný, Lachema Brno, ČR

Kyselina acetylsalicylová, Balex, Pardubice – Rosice n.L., ČR

Kyselina octová, p.a., PENTA, Chrudim, ČR

Kyselina *o*-fosforečná 85 %, p.a., PENTA, Chrudim, ČR

Methanol, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Německo

Methylalkohol p.a., PENTA, Chrudim, ČR

Methylparaben, Fluka, Německo

Octan amonný, Balex, Pardubice – Rosice na L., ČR

Perindopril, Sigma – Aldrich, Německo

Propylparaben, Fluka, Německo

Sodná sůl hexansulfonové kyseliny, Sigma – Aldrich, Německo

Sulfamethoxazol, Léčiva Praha, ČR

Sulfamethoxydin, Léčiva Praha, ČR

Sulpirid, Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

Tetrabutylamonium bromid, Fluka Chemie, Německo

Triethylamin, Fluka Chemie, Sigma – Aldrich, Steinheim, Německo

Voda čištěná reverzní osmózou

## 4.2 Vypracování chromatografických podmínek pro HPLC analýzu perindoprilu a indapamidu

Vypracování chromatografických podmínek pro HPLC analýzu kombinovaného přípravku perindoprilu a indapamidu spočívalo především v nalezení vhodné stacionární a mobilní fáze, určení optimální průtokové rychlosti a teploty při analýze a výběru správného vnitřního standardu a vlnové délky pro UV detekci.

### VÝBĚR STACIONÁRNÍ A MOBILNÍ FÁZE

Hledání podmínek pro současnou HPLC analýzu perindoprilu a indapamidu začalo výběrem vhodné kolony (potažmo stacionární fáze) a mobilní fáze. Byla vyzkoušena řada kombinací za různých teplot (25-50°C) a pH (3-5) s průtokovou rychlostí v rozmezí 0,3 – 1,7 ml/min. Indapamid v téměř všech případech vykazoval hodnotitelný chromatogram na rozdíl od perindoprilu, kvůli kterému bylo vyzkoušeno toto množství kombinací.

KOLONA Separon CGC, SGX C18, 4 x 150 mm, 5 µm

Methanol – voda okyselená kyselinou fosforečnou na pH 3,2 50:50  
průtoková rychlost 0,8 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,2 50:50 průtoková rychlost 0,8 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,2 70:30 průtoková rychlost 0,8 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,005 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,2 50:50 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,005 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,2 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C



Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,2 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

KOLONA LiChro CART 250-4 LiChrospher 100, RP18, 5 µm I

Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,3 60:40 průtoková rychlost 0,8 ml/min, 25°C

Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,3 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,3 + sodná sůl kyseliny hexansulfonové (0,05 g/100 ml) 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 + sodná sůl kyseliny hexansulfonové (0,05 g/100 ml) 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 + sodná sůl kyseliny hexansulfonové (0,05 g/100 ml) 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

KOLONA Separon CGC, SGX CN, 3 x 150 mm, 5 µm

Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 60:40 průtoková rychlost 0,5 ml/min, 25°C

Methanol – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,3 + sodná sůl kyseliny hexansulfonové (0,05 g/100ml) 40:60 průtoková rychlost 0,5 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 60:40 průtoková rychlost 0,5 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 60:40 průtoková rychlost 0,3 ml/min, 25°C

KOLONA Discovery cyano, 150 x 4,6 mm , 5 µm

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 + triethylamin (0,1 ml/100 ml) 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 + tetrabutylamonium bromid (0,1 g/100 ml) 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Methanol – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 + tetrabutylamonium bromid (0,1 g/100 ml) 60:40 průtoková rychlost 0,6 ml/min, 25°C

Methanol – voda – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,2 + triethylamin (0,1 ml/100 ml) 30:30:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Acetonitril – voda okyselená kyselinou fosforečnou na pH 3,2 + triethylamin (0,1 ml/100 ml) 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Acetonitril – voda okyselená kyselinou fosforečnou na pH 3,2 + triethylamin (0,1 ml/100 ml) 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Acetonitril – voda okyselená kyselinou fosforečnou na pH 3,2 + triethylamin  
(0,1 ml/100 ml) 70:30 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

KOLONA LiChro CART 250-4 LiChrospher 100, RP18, 5 µm II

Acetonitril – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Acetonitril – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1,3 ml/min, 25°C

Acetonitril – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1,7 ml/min, 25°C

Acetonitril – roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,01 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 30°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 40°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 45°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 2,7 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,5 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 4 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 4,5 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 5 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1,3 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 50:50 průtoková rychlost 1,2 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 50:50 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Methanol - roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou fosforečnou na pH 3,5 + triethylamin (0,1 ml/100 ml) 70:30 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok octanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou octovou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok octanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou octovou na pH 3 60:40 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok octanu amonného (0,05 mol/l) okyselený kyselinou octovou na pH 3 50:50 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok octanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml) okyseleno kyselinou octovou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok octanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml) okyseleno kyselinou octovou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1,2 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml) okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml) okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 45°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml) okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 40°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml) okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 35°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml) okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 30°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 25°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 20:80 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 30:70 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 50:50 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 4 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 5 40:60 průtoková rychlost 1 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 0,6 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 0,8 ml/min, 50°C

Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin (0,1 ml/100 ml)  
okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60 průtoková rychlost 1,2 ml/min, 50°C

**Acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) + triethylamin  
(0,1 ml/100 ml) okyseleno kyselinou fosforečnou na pH 3 40:60  
průtoková rychlost 1,4 ml/min, 50°C**

## VÝBĚR VNITŘNÍHO STANDARDU

Pro kvantitativní hodnocení vzorku byla použita metoda vnitřního standardu, což znamenalo především zvolit vhodný vnitřní standard. Bylo vybíráno z následujících látek:

Acetanilid	Chloracetanilid
Benetazon	Kyselina acetylsalicylová
Klotrimazol	Methylparaben
Diklofenak	Propylparaben
Ethylparaben	Sulfamethoxazol
Fenacetin	Sulfamethoxydin
Chloramfenikol	Sulpirid

Jako nejvhodnější vnitřní standard se ukázal propylparaben.

## VÝBĚR VLNOVÉ DÉLKY PRO UV DETEKCI

Součástí použitého chromatografického zařízení byl detektor s nastavitelnou vlnovou délkou. Vlnová délka byla vybrána na základě měření UV spekter perindoprilu, indapamidu a propylparabenu.

## PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE A ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ A VZORKŮ

### Mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla použita kombinace acetonitril – roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) v poměru 40:60 + triethylamin (0,1 ml/100 ml) okyselená kyselinou fosforečnou na pH 3.

Roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) byl připraven navážením 3,3014 g fosforečnanu amonného s následným rozpuštěním v 500 ml vody čištěné reverzní osmózou. Po smíchání s acetonitrilem v poměru 60:40 byl k tomuto roztoku přidán triethylamin (0,1 ml/100 ml) a následně okyselen kyselinou fosforečnou na pH 3.

## **Zásobní roztoky**

### Zásobní roztok perindoprilu o koncentraci 1 mg/ml:

Zásobní roztok byl připraven navážením 10 mg perindoprilu a následným rozpuštěním v 10 ml methanolu.

### Zásobní roztok indapamidu o koncentraci 0,5 mg/ml:

Zásobní roztok byl připraven navážením 5 mg indapamidu a následným rozpuštěním v 10 ml methanolu.

### Zásobní roztok vnitřního standardu (propylparaben) o koncentraci 1 mg/ml:

Zásobní roztok byl připraven navážením 10 mg propylparabenu a následným rozpuštěním v 10 ml methanolu.

Bylo vyzkoušeno i rozpuštění standardů v acetonitrilu místo methanolu, což však nepřineslo pozitivní ovlivnění výsledku, spíše naopak, píky nebyly symetrické a došlo k rozšíření jejich základny.

## **Roztoky pro kalibrační křivku**

Pro sestrojení kalibrační křivky bylo připraveno 5 roztoků s postupně se zvyšující koncentrací. K přípravě těchto roztoků byly použity zásobní roztok perindoprilu o koncentraci 1 mg/ml, zásobní roztok indapamidu o koncentraci 0,5 ml/ml a zásobní roztok propylparabenu o koncentraci 1 mg/ml. Byly napipetovány potřebné objemy jednotlivých složek (složení jednotlivých roztoků pro sestrojení kalibrační křivky viz tabulka č.1) do 5 ml odměrných baněk a doplněné methanolem.

Příprava jednotlivých kalibračních roztoků:

Perindopril – roztok o koncentraci 0,1 mg/ml: bylo pipetováno 0,5 ml zásobního roztoku perindoprilu (1 mg/ml), přidáno 0,25 ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.



Perindopril – roztok o koncentraci 0,15 mg/ml: bylo pipetováno 0,75 ml zásobního roztoku perindoprilu (1 mg/ml), přidáno 0,25 ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Perindopril – roztok o koncentraci 0,2 mg/ml: byl pipetován 1 ml zásobního roztoku perindoprilu (1 mg/ml), přidáno 0,25 ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Perindopril – roztok o koncentraci 0,3 mg/ml: bylo pipetováno 1,5 ml zásobního roztoku perindoprilu (1 mg/ml), přidáno 0,25 ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Perindopril – roztok o koncentraci 0,4 mg/ml: byly pipetovány 2 ml zásobního roztoku perindoprilu (1 mg/ml), přidáno 0,25 ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Indapamid – roztok o koncentraci 0,03 mg/ml: bylo pipetováno 0,3 ml zásobního roztoku indapamidu (0,5 mg/ml), přidáno 0,25 mg/ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Indapamid – roztok o koncentraci 0,04 mg/ml: bylo pipetováno 0,4 ml zásobního roztoku indapamidu (0,5 mg/ml), přidáno 0,25 mg/ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Indapamid – roztok o koncentraci 0,05 mg/ml: bylo pipetováno 0,5 ml zásobního roztoku indapamidu (0,5 mg/ml), přidáno 0,25 mg/ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Indapamid – roztok o koncentraci 0,06 mg/ml: bylo pipetováno 0,6 ml zásobního roztoku indapamidu (0,5 mg/ml), přidáno 0,25 mg/ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Indapamid – roztok o koncentraci 0,08 mg/ml: bylo pipetováno 0,8 ml zásobního roztoku indapamidu (0,5 mg/ml), přidáno 0,25 mg/ml vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a následně doplněno methanolem do 5 ml.

Tab. č. 1: Složení roztoků pro sestavení kalibrační křivky

<b>Kalibrační křivka - koncentrace jednotlivých látek ve vzorcích</b>			
číslo vzorku	koncentrace perindoprilu	koncentrace indapamidu	koncentrace propylparabenu
1	0,1 mg/ml	0,03 mg/ml	0,05 mg/ml
2	0,15 mg/ml	0,04 mg/ml	0,05 mg/ml
3	0,2 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml
4	0,3 mg/ml	0,06 mg/ml	0,05 mg/ml
5	0,4 mg/ml	0,08 mg/ml	0,05 mg/ml

### **Roztoky pro stanovení obsahu**

Bylo zváženo deset tablet ( $m = 0,913$  g) a určena hmotnost jedné tablety ( $m = 0,0913$  g). Tyto tablety byly rozdrceny a promíseny. Po navážení množství odpovídající jedné tabletě byl připraven roztok pro stanovení obsahu.

Navážka byla rozpuštěna v methanolu v ultrazvukové lázni (10 minut), poté byl roztok centrifugován (5 minut, při 5000 otáčkách), přidán roztoku vnitřního standardu (0,05 mg/ml) a doplněn methanolem na 25 ml v odměrné baňce.

## **5. Výsledky a diskuse**

### **5.1 Chromatografické podmínky pro HPLC analýzu perindoprilu a indapamidu**

#### **STACIONÁRNÍ FÁZE**

Během hledání vhodné stacionární fáze pro současnou analýzu perindoprilu a indapamidu bylo vyzkoušeno pět různých kolon. Jako nejvhodnější se ukázala chromatografická kolona LiChro CART 250-4 LiChrospher 100, RP18, 5 µm.

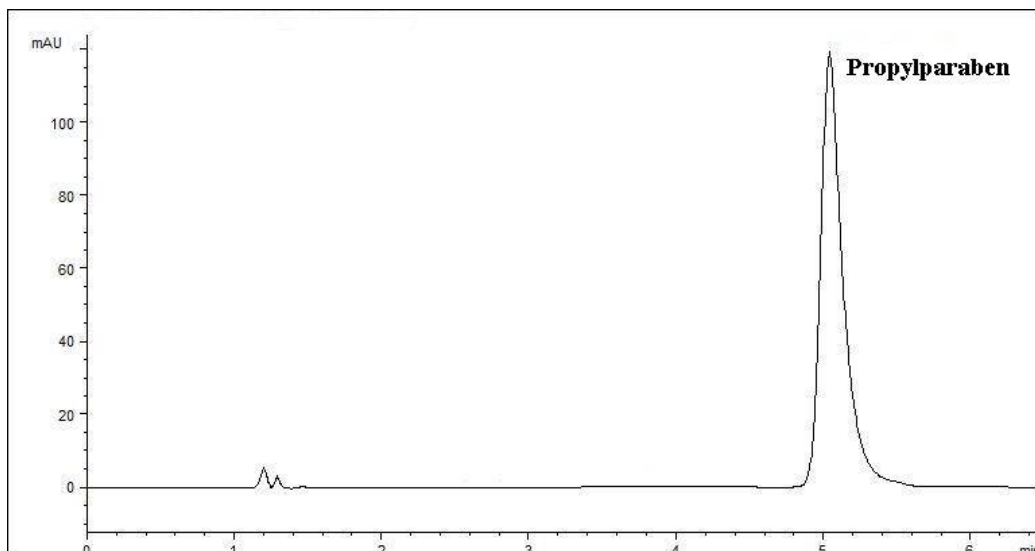
#### **MOBILNÍ FÁZE**

Pro nalezení optimálních podmínek analýzy bylo nutno vyzkoušet různé složení mobilní fáze. Kromě několika pufrů byly vyzkoušeny i různé organické složky mobilní fáze (acetonitril, methanol), v nejrůznějších poměrech.

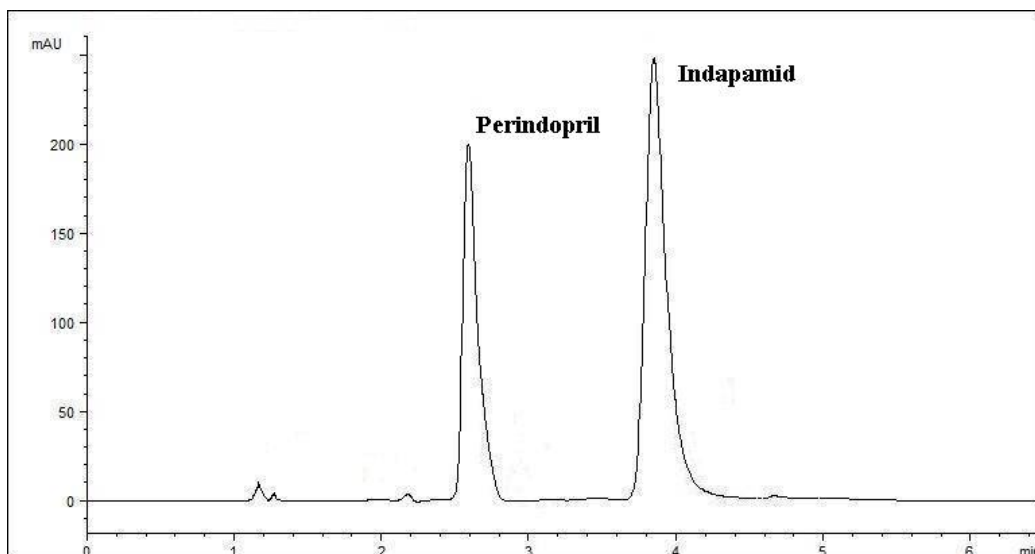
Pro dostatečné rozlišení píků a vzniku hodnotitelných chromatogramů byla vybrána jako nejvhodnější mobilní fáze o složení roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) a acetonitril v poměru 60:40 s přidavkem triethylaminu (0,1 ml/100 ml) okyselená kyselinou fosforečnou na pH 3.

#### **VNITŘNÍ STANDARD**

Jako vnitřní standard bylo vyzkoušeno několik látek. Nejvhodnějším vnitřním standardem z těchto látek se ukázal propylparaben, jehož retenční čas byl v blízkosti retenčních časů zkoušených látek. Propylparaben vykazoval štíhlý symetrický pík s dostatečným rozlišením na základní linii. Retenční časy ostatních potenciálních standardů se kryly se vzorky, byly mnohem delší nebo kratší, anebo se hodnotitelný pík vůbec nevytvořil, tudíž byly nevyhovující.



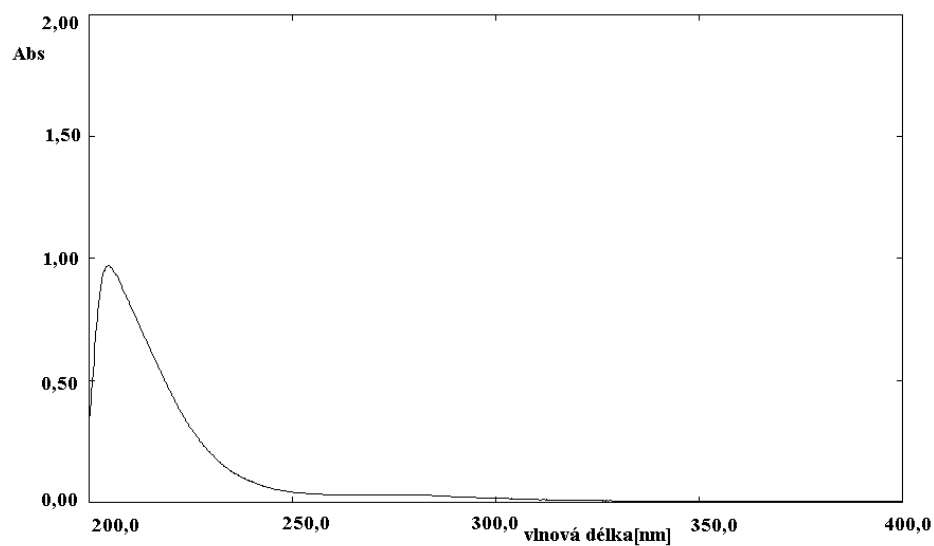
Obr. č. 6: Chromatografický záznam vnitřního standardu propylparabenu (0,05 mg/ml) za nalezených podmínek viz 5.1



Obr. č. 7: Chromatografický záznam směsi standardů perindoprilu (0,2 mg/ml) a indapamidu (0,05 mg/ml) za nalezených podmínek viz 5.1

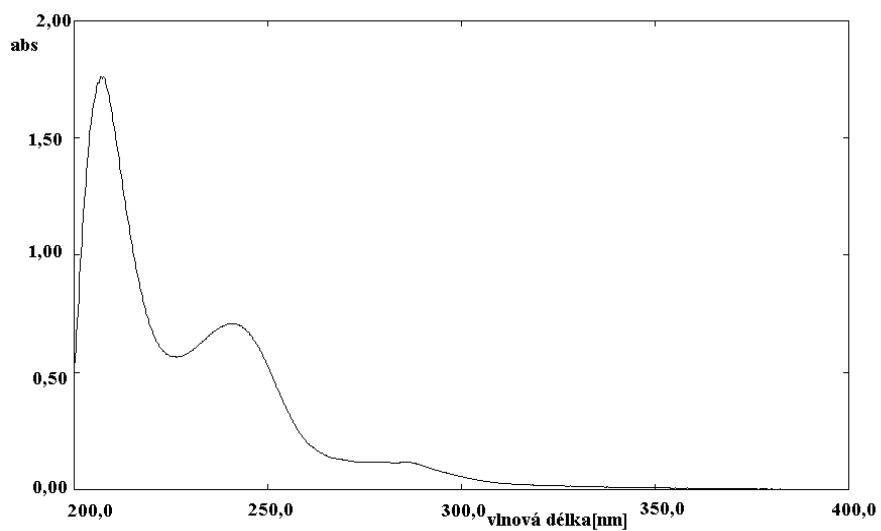
## DETEKCE

Detektor s nastavitelnou vlnovou délkou byl nastaven na 215 nm. Tato vlnová délka byla vybrána na základě předchozího měření UV spekter perindoprilu, indapamidu a propylparabenu.



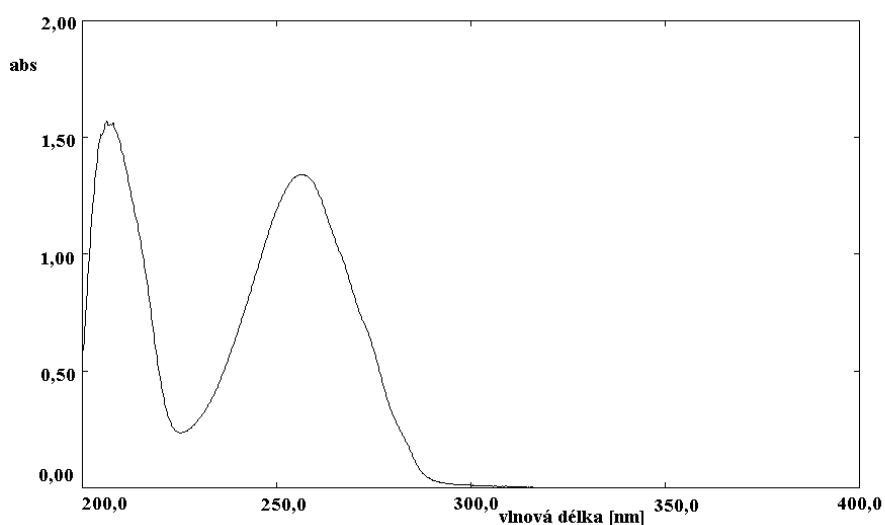
Obr. č. 8: UV spektrum perindoprilu

No.	Vlnová délka (nm.)	Absorbance
1	356,40	0,0042
2	272,80	0,0315
3	204,60	0,9712



Obr. č. 9: UV spektrum perindoprilu

No.	Vlnová délka (nm.)	Absorbance
1	334,80	0,0123
2	285,40	0,1165
3	240,20	0,7076
4	206,80	1,7635



Obr. č. 10: UV spektrum propylparabenu

No.	Vlnová délka(nm.)	Absorbance
1	353,60	0,0010
2	339,80	0,0007
3	256,80	1,3424
4	206,20	1,5705

Kromě výběru stacionární a mobilní fáze (o určeném pH) a zvolení optimální vlnové délky bylo zapotřebí zjistit další podmínky, tj. teplotu a průtokovou rychlost. Na základě několika měření byla za nejvhodnější určena teplota 50°C a průtoková rychlost 1,4 ml/min. Pro potvrzení správnosti zvolených podmínek bylo provedeno hodnocení s pozměněním vždy jedné z podmínek (teplota, poměr mobilní fáze, pH, průtoková rychlost).

#### Změna teploty

– měření při teplotách 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C.

Bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou se zkracuje retenční čas, tvar píku není v podstatě ovlivněn. V rámci trendu zkracování analýz byla zvolena teplota 50 °C.

#### Změna poměru mobilní fáze

– měření při složení mobilní fáze acetonitril : roztok fosforečnanu amonného v poměru 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40.

Jako nejvhodnější poměr jednotlivých složek mobilní fáze byl zvolen poměr 40:60, protože v ostatních případech nedošlo k dostatečnému oddělení píků na základní linii nebo vůbec vzniku hodnotitelného chromatogramu.

#### Změna pH mobilní fáze

– vyzkoušené pH 3, 4, 5.

Se zvyšujícím pH se měnil i chromatogram, docházelo k výraznějšímu zhoršení rozlišení píků, proto bylo zvoleno pH 3. Při nižších hodnotách pH se měření neprovádělo kvůli odolnosti a životnosti kolony.

#### Změna průtokové rychlosti mobilní fáze

– bylo provedeno měření při průtoku 0,6 ml/min, 0,8 ml/min, 1 ml/min, 1,2 ml/min, 1,4 ml/min.

Nízká průtoková rychlost měla za následek výrazné prodloužení retenčních časů jednotlivých látek i drobnou deformaci píků. K vyšším průtokovým rychlostem se nepřistoupilo kvůli vyšším nárokům na tlak. Jako optimální byla zvolena průtoková rychlost 1,4 ml/min.

## **5.2 Stanovení obsahu**

### **KALIBRAČNÍ KŘIVKY**

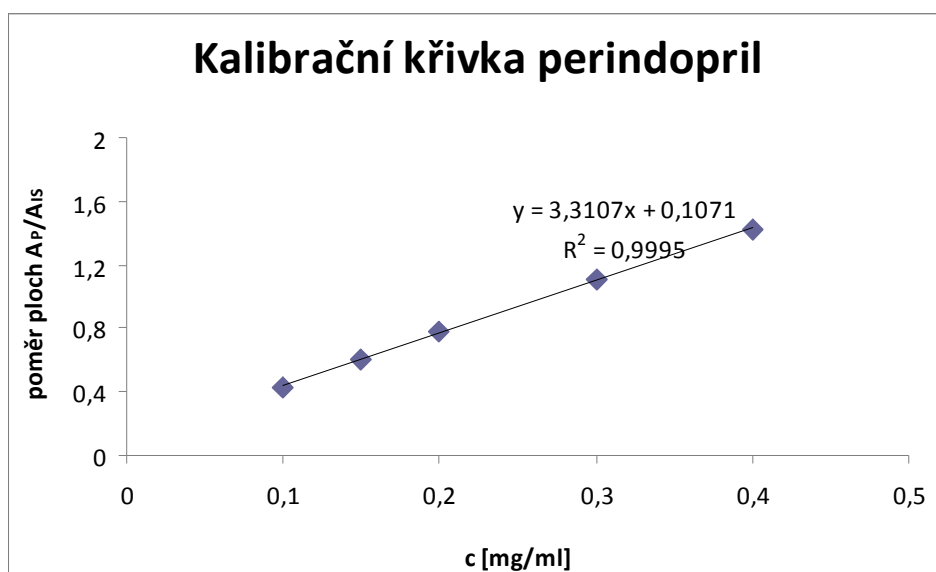
Kalibrační křivka je závislost odezvy, tj. poměru ploch zkoumané látky (perindopril, indapamid) a vnitřního standardu, na jejich koncentraci. Tato křivka prochází pěti body (pět vzorků s postupně rostoucí koncentrací). Každý vzorek byl nastříknut pětkrát. Kalibrační křivka byla měřena za stejných chromatografických podmínek, které byly zjištěny jako optimální pro analýzu kombinovaných přípravků obsahujících perindopril a indapamid.



## Kalibrační křivka – perindopril

Tab. č. 2: Hodnoty perindoprilu pro sestavení kalibrační křivky

Kalibrační křivka - perindopril				
koncentrace perindoprilu	koncentrace vnitřního standardu	číslo měření	poměr ploch píků	průměr
P [mg/ml]	IS [mg/ml]		$A_P/A_{IS}$	$A_P/A_{IS}$
0,10	0,05	1.1	0,4217	0,4270
		1.2	0,4375	
		1.3	0,3611	
		1.4	0,4488	
		1.5	0,4644	
0,15	0,05	2.1	0,6030	0,6078
		2.2	0,6735	
		2.3	0,5922	
		2.4	0,5818	
		2.5	0,5887	
0,20	0,05	3.1	0,7752	0,7789
		3.2	0,7718	
		3.3	0,7826	
		3.4	0,7835	
		3.5	0,7815	
0,30	0,05	4.1	1,1000	1,1048
		4.2	1,0994	
		4.3	1,1090	
		4.4	1,1157	
		4.5	1,1000	
0,40	0,05	5.1	1,4381	1,4244
		5.2	1,4454	
		5.3	1,4179	
		5.4	1,3889	
		5.5	1,4318	



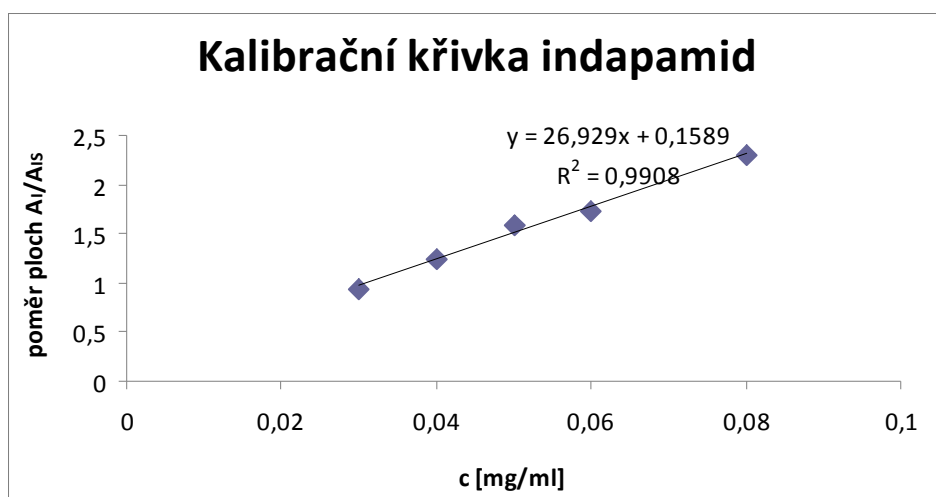
Obr. č. 11: Kalibrační křivka perindoprilu

Kalibrační křivku perindoprilu popisuje rovnice:  $y = 3,3107x + 0,1071$

## Kalibrační křivka – indapamid

Tab. č. 3: Hodnoty indapamidu pro sestrojení kalibrační křivky

Kalibrační křivka - indapamid				
koncentrace indapamidu	koncentrace vnitřního standardu	číslo měření	poměr ploch píků	průměr
I [mg/ml]	IS [mg/ml]		$A_I/A_{IS}$	$A_I/A_{IS}$
0,03	0,05	1.1	0,9148	0,9289
		1.2	0,9149	
		1.3	0,8942	
		1.4	0,9325	
		1.5	0,9882	
0,04	0,05	2.1	1,2238	1,2469
		2.2	1,3112	
		2.3	1,2447	
		2.4	1,2278	
		2.5	1,2268	
0,05	0,05	3.1	1,5741	1,5846
		3.2	1,5927	
		3.3	1,5897	
		3.4	1,5787	
		3.5	1,5879	
0,06	0,05	4.1	1,7291	1,7287
		4.2	1,7291	
		4.3	1,7357	
		4.4	1,7399	
		4.5	1,7097	
0,08	0,05	5.1	2,326	2,3069
		5.2	2,3322	
		5.3	2,2756	
		5.4	2,3001	
		5.5	2,3007	



Obr. č. 12: Kalibrační křivka indapamidu

Kalibrační křivku indapamidu popisuje rovnice:  $y = 26,929x + 0,1589$

## STANOVENÍ OBSAHU

Byly připraveny vzorky z léčivého přípravku, který obsahuje kombinaci perindoprilu a indapamidu. Léčivo má deklarované množství 5 mg perindopril - argininu a 1,25 mg indapamidu. Stanovení obsahu účinné látky v tabletě proběhlo na základě dosazení poměru ploch perindoprilu a propylparabenu ( $A_P/A_{IS}$ ) nebo indapamidu a propylparabenu ( $A_I/A_{IS}$ ) do rovnice popisující příslušnou kalibrační křivku. Takto zjištěná koncentrace byla vztažena na průměrnou hodnotu tablety a výsledek byl vyjádřen jako procenta deklarovaného množství. Stanovení proběhlo za stejných chromatografických podmínek, které byly zjištěny jako optimální pro analýzu kombinovaných přípravků obsahujících perindopril a indapamid.

Kalibrační křivku perindoprilu popisuje rovnice:  $y = 3,3107x + 0,1071$

Kalibrační křivku indapamidu popisuje rovnice:  $y = 26,929x + 0,1589$

Procentuální obsah perindoprilu (indapamidu) vzhledem k deklarovanému obsahu v 1 tabletě byl vypočten podle následujícího vzorce:

$$m(\%) = \frac{x \times 25 \times \text{prům.hmotn.} \times 100}{n \times 5}$$

průměrná hmotnost 1 tablety je 0,0913 g

x - hodnota vypočítaná z kalibrační křivky

25 - zředění

n – navážka;

vzorek č.1: n = 0,0913 g; vzorek č.2: n = 0,0914 g; vzorek č.3: n = 0,0911 g

5 (1,25) - deklarované množství perindoprilu (indapamidu) v 1 tabletě

Tab. č. 4: Hodnoty perindoprilu pro stanovení obsahu

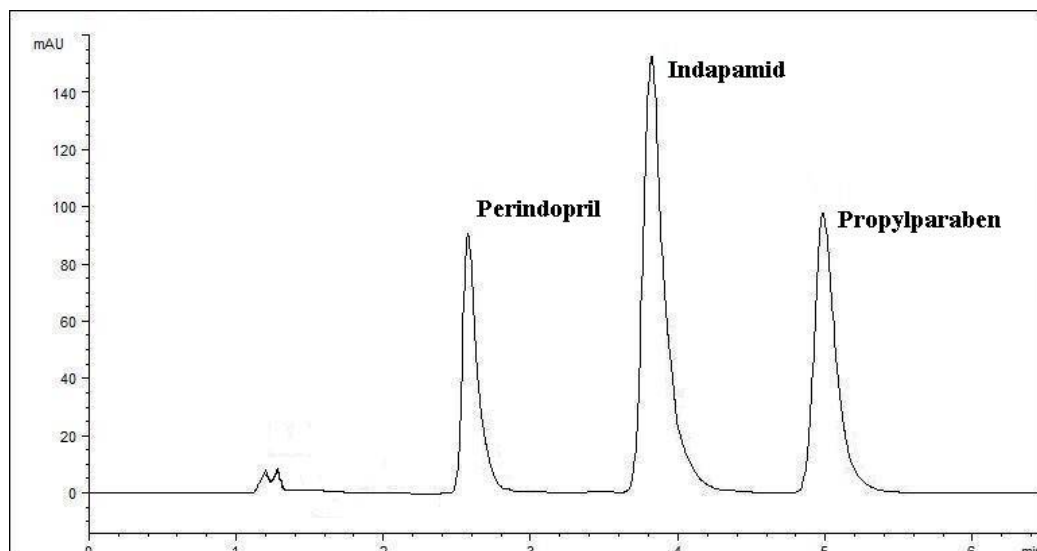
číslo vzorku	poměr ploch píků $A_P/A_{IS}$	průměr $A_P/A_{IS}$	hodnota vypočítaná z kalibrační křivky perindoprilu	obsah perindoprilu vzhledem k deklarovanému obsahu v tbl.[%]
1	0,7909	0,7938	0,2074	103,70
	0,7842			
	0,7911			
	0,8003			
	0,8027			
2	0,7832	0,7919	0,2068	103,63
	0,7897			
	0,7922			
	0,7918			
	0,8026			
3	0,8013	0,7958	0,2080	103,89
	0,7953			
	0,7892			
	0,7974			
	0,7956			

Každá tableta obsahuje průměrně 5,1869 mg perindoprilu, což odpovídá 103,74% deklarovaného množství.

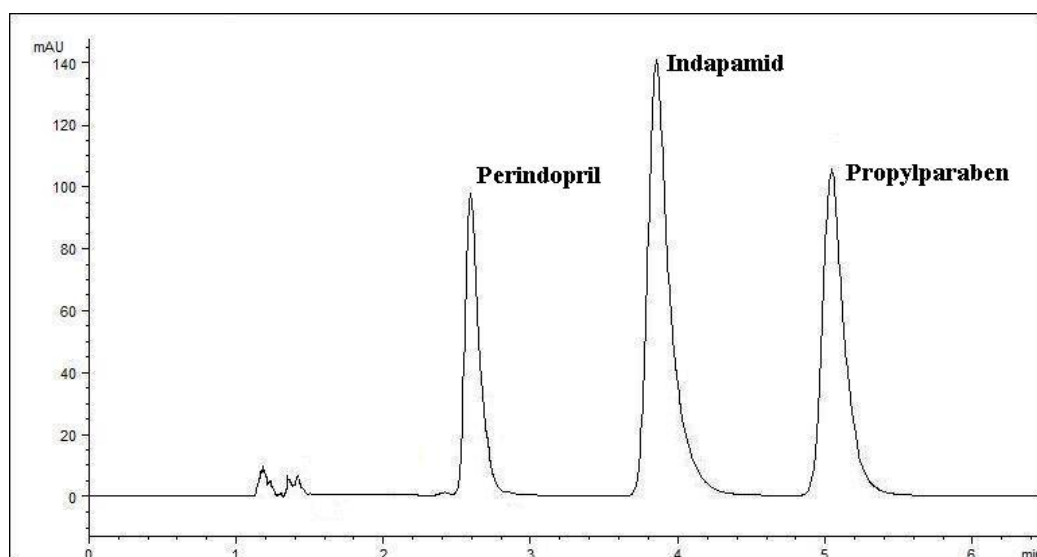
Tab. č. 5: Hodnoty indapamidu pro stanovení obsahu

číslo vzorku	poměr ploch píků $A_I/A_{IS}$	průměr $A_I/A_{IS}$	hodnota vypočítaná z kalibrační křivky indapamidu	obsah indapamidu vzhledem k deklarovanému obsahu v tbl.[%]
1	1,4505	1,4443	0,0477	95,40
	1,4472			
	1,4411			
	1,4397			
	1,4428			
2	1,4472	1,4451	0,0478	95,81
	1,4516			
	1,4407			
	1,4399			
	1,4462			
3	1,4478	1,4496	0,0479	95,70
	1,4493			
	1,4479			
	1,4499			
	1,4532			

Každá tableta obsahuje průměrně 1,1954 mg indapamidu, což odpovídá 95,64% deklarovaného množství.



Obr. č. 13: Chromatografický záznam směsi standardů odpovídající složení HVLP přípravku s přidavkem vnitřního standardu: perindopril (0,2 mg/ml), indapamid (0,05 mg/ml) a propylparaben (0,05 mg/ml) za nalezených podmínek viz 5.1



Obr. č. 14: Chromatografický záznam kombinované tablety perindoprilu (0,2 mg/ml) a indapamidu (0,05 mg/ml) s přidavkem vnitřního standardu propylparabenu (0,05 mg/ml) za nalezených podmínek viz 5.1



## 6. Závěr

V této diplomové práci byly vypracovány vhodné podmínky pro současnou HPLC analýzu perindoprilu a indapamidu v kombinovaném léčivém přípravku.

Po vyzkoušení několika kombinací chromatografických podmínek, byla jako nejvhodnější zvolena chromatografická kolona LiChro CART 250-4 LiChrospher 100, RP18, 5  $\mu\text{m}$  a mobilní fáze o složení roztok fosforečnanu amonného (0,05 mol/l) a acetonitril v poměru 60:40 s přídavkem triethylaminu (0,1 ml/100 ml) okyselena kyselinou fosforečnou na pH 3. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,4 ml/min při teplotě 50°C. Jako nejvhodnější vnitřní standard byl zvolen propylparaben. Detekce proběhla pomocí UV detektoru při vlnové délce 215 nm.

Při stanovení obsahu bylo zjištěno, že každá kombinovaná tableta obsahuje průměrně 5,1869 mg perindoprilu a 1,1954 mg indapamidu, což odpovídá 103,74 % množství perindoprilu a 95,64 % množství indapamidu deklarovaného výrobcem.

## 7. Literatura:

1. F. Švec: Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?, Chemické listy, 103, 266-270 (2009)
2. J. Churáček, S. Kotrlý: Analytická chemie II, Vysoká škola chemicko-technologická v Pardubicích, Pardubice 1983
3. E. Smolková-Keulemansová a kol.: Moderní separační metody, Československá akademie věd, EDICE MACRO, Praha 1988
4. J. Klimeš: Kontrola léčiv I, Karolinum, Praha 2002
5. R. Karlíček: Analytická chemie, Karolinum, Praha 2001
6. P. Klouda: Moderní analytické metody, Ostrava 1996
7. J. Jampalík, R. Opatřilová, I. Liška: Návodů do cvičení z analytické chemie, vybrané instrumentální metody, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno 2007
8. F. Vlácil: Úvod do dělicích metod. In J. Zýka a kol.: Analytická příručka 1, SNTL/ALFA, Praha 1979
9. V. Jokl, R. Karlíček, D. Svobodová: Stručné základy analytické chemie pro posluchače farmacie II, Univerzita Karlova v Praze, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1988
10. R. Komers, M. Krejčí: Plynová chromatografie. In O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
11. Ž. Procházka, M. Hejtmánek, K. Šebesta, V. Tomášek: Papírová chromatografie. In O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
12. F. Čůta a kol.: Návodů pro cvičení ve speciálních metodách analytických, SNTL, Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, Praha 1963
13. J. Churáček, P. Jandera: Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie, SNTL, Praha 1984
14. J. Churáček, P. Jandera: Separace látek, kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie, SNTL, Vysoká škola chemicko-technologická v Pardubicích, Pardubice 1981
15. V. Pacáková, K. Štulík: Vysokoúčinná chromatografie, Univerzita Karlova v Praze, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986
16. A. V. Kiselev, J. A. I. Jašin: Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie, SNTL, Praha 1988

17. V. Miller: Pracovní technika. In M. Šaršúnová, O. Manč: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie vo farmácii a biochémií, Osveta 1985
18. O. Mikeš, J. Štamberg, M. Hejtmánek, K. Šebesta: Iontově výměnná chromatografie. In O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
19. J. Portych, J. Děták, Š. Mareček, M. Lehký: Základy farmaceutické analýzy, úvod do kontroly léčiv, Osveta, 1978
20. P. Jandera, J. Churáček: Kapalinová chromatografie s programovaným složením mobilní fáze, ACADEMIA, nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1984
21. F. Renger, J. Kalous: Analytická chemie I, Univerzita Pardubice, Pardubice 1998
22. V. Tomášek: Gelová chromatografie. In O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
23. L. Nováková: Pokroky v HPLC.....a další vybrané kapitoly, přednáška z předmětu Speciální metody instrumentální analýzy, staženo 21.2.2011 z veřejných složek fakulty (FAF v HK)
24. C. R. Lowe, P. D. G. Dean: Afinitní chromatografie, SNTL, Praha 1979
25. K. Štulík a kol.: Analytické separační metody, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 2004
26. M. Šaršúnová: Základné pojmy vo vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii. In M. Šaršúnová, O. Manč: Vysokoúčinná kapalinová chromatografia vo farmácii a biochémií, Osveta 1985
27. J. Klimeš: Kontrola léčiv II, Karolinum, Praha 2002
28. J. Klíma, J. Grafnetterová: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii, Pokroky ve farmácii 7, Avicenum, Praha 1987
29. B. Meloun: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kapalinové chromatografii. In O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
30. P. Solich: Pokroky v kapalinové chromatografii, přednáška z předmětu Speciální metody instrumentální analýzy, staženo 21.2.2011 z veřejných složek fakulty (FAF v HK)
31. R. Karlíček: HPLC – High Performance Liquid Chromatography, přednáška z předmětu Speciální metody instrumentální analýzy, staženo 21.2.2011 z veřejných složek fakulty (FAF v HK)

32. K. Motyka, J. Hlaváč: Stručný přehled separačních metod, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2009
33. Český lékopis 2009; Grada publishing, Praha 2009
34. J. Špinar, J. Vítovec: Perindopril/indapamid – fixní kombinace; Remedia 3/2007, <http://www.remmedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2007/3-2007/Perindopril-indapamid-fixni-kombinace/e-9p-9X-hN.magarticle.aspx>
35. AISLP, Automatizovaný informační systém léčivých přípravků, souhrn SPC 58/095/09-C, datum revize textu 16.9.2009, verze platná k 1.7.2010
36. J. Špinar, J. Vítovec: Perindoprilum; Remedia 2/2005, <http://www.remmedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2005/2-2005/Perindoprilum/e-9n-9K-bA.magarticle.aspx>
37. J. Suchopár a kol.: Remedia, 4.vydání; Panax, 2009
38. P. Červený, H. Koblihová: Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu: přehled a porovnání základních údajů, Remedia 3/2009, <http://www.remmedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2009/3-2009/Inhibitory-angiotenzin-konvertujiciho-enzymu-prehled-a-porovnani-zakladnich-udaju/e-a7-aa-FY.magarticle.aspx>
39. M. Remko, A. Remková: Perindopril arginin: nová sůl inhibitoru ACE perindoprilu a její přínos, Remedia 4/2007, <http://www.remmedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2007/4-2007/Perindopril-arginin-nova-sul-inihibitoru-ACE-perindoprilu-a-jeji-prinos/e-9p-9Y-ik.magarticle.aspx>
40. AISLP, Automatizovaný informační systém léčivých přípravků, souhrn SPC 58/768/09-C, datum revize textu 11.11.2009, verze platná k 1.7.2010
41. D. Lincová, H. Farghali a kol.: Základní a aplikovaná farmakologie, 2.vydání, Galén, 2009
42. G. Pektaş, E. Dinç: Combined application of continuous wavelet transform-zero crossing technique in the simultaneous spectrophotometric determination of perindopril and indapamid in tablets, Quimica Nova, 32, 1416-1421 (2009)
43. N. Erk: Comparison of spectrophotometric and an LC method for the determination perindopril and indapamide in pharmaceutical formulations, J. Pharm. Biomed. Anal., 26, 43-52 (2001)
44. H. Jogia, U. Khandelwal, T. Gandhi, S. Singh, D. Modi: J. AOAC Int., 93, 108-115 (2010)

45. A. A. Elshanawane, S. M. Mostafa, M. S. Elgawish: Development and Validation of LC Metod for Simultaneous Determination of Two Binary Mixtures Containing Indapamid, *Chromatographia*, 67, 837-840 (2008)
46. M. G. Dewani, K. G. Bothara, A. R. Madgulkar, M. C. Damle: Simultaneous estimation of perindopril erbumine and indapamide in bulk drug and table dosage form by HPTLC, *Pharmacie Globale (IJCP)*, 02, 1-4 (2011)
47. A. El-Gindy, S. Emara, G. M. Hadad: Determination of certain drugs in binary mixtures formulations by second derivative ratio spectrophotometry and LC, *Science direct, Farmaco*, 59, 703-712 (2004)
48. M. C. Damle, D. G. Mohit, B. G. Kailash: Development and validation of stability indicating HPTLC method for determination od perindopril erbumine, *Int. Res. J. Pharm.*, 01, 428-435 (2010)
49. A. I. Patel a kol.: RP-HPLC method for the determination of losartan potassium and perindopril erbumine in combined tablet dosage form, *International Journal od Pharma and Bio Science*, 1, 709-715 (2011)
50. M. Medenica, D. Ivanović, M. Mašković, B. Jančić, A. Malenović: Evaluation of impurities level of perindopril tert-butylamine in tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 1087-1094 (2007)
51. A. B. Chaudhary, R. K. Patel, S. A. Chaudhary: Determination of Losartan Potassium and Perindopril Erbumine in Tablet Formulations by Reversed-Phase HPLC, *International Journal of Chejrech Research*, 2, 1141-1146 (2010)